

ANTICUERPO MULTIESPECÍFICO DIRIGIDO A BCMA, GPRC5D Y LINFOCITOS T Y APLICACIÓN DEL MISMO

Referencia cruzada a solicitud relacionada

- 5 **[0001]** La presente solicitud reivindica el derecho de prioridad de la solicitud de patente china N.º 202210631397.9, presentada el 06 de junio de 2022, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad a todos los efectos.

Campo técnico

- 10 **[0002]** La presente divulgación se refiere al campo de la biomedicina, en particular a un anticuerpo multiespecífico dirigido a BCMA, GPRC5D y linfocitos T y la aplicación del mismo.

Antecedentes

- 15 **[0003]** El mieloma múltiple (MM) es un tumor neoplásico maligno de células plasmáticas que se caracteriza por la proliferación irrestricta de células plasmáticas en la médula ósea como células tumorales, acompañado de secreción de inmunoglobulinas monoclonales, que provoca una serie de manifestaciones clínicas tales como daño osteolítico múltiple, hipercalcemia, anemia, daño renal e infecciones repetidas. El
- 20 mieloma múltiple representa el 1 % de todos los tumores y el 10 %-15 % de las neoplasias hematológicas. La proporción de hombres a mujeres es de 1,6 : 1 y la mayoría de los pacientes tienen más de 40 años. El tratamiento del mieloma múltiple incluye quimioterapia, trasplante de células madre hematopoyéticas, etc. Entre ellos, los inmunomoduladores representados por lenalidomida e inhibidores de proteasa
- 25 representados por bortezomib, usados solos o en combinación, han demostrado una buena eficacia y se han convertido en métodos de tratamiento convencionales para pacientes con mieloma múltiple. Sin embargo, el mieloma múltiple todavía se considera una enfermedad incurable. En la actualidad, los métodos de tratamiento solo pueden aliviar los síntomas del mieloma múltiple, pero ninguno de ellos puede eliminar
- 30 completamente el tumor. Casi todos los pacientes finalmente recaerán. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas opciones de tratamiento.

[0004] En los últimos años, se han logrado avances en el uso de la terapia CAR-T o la terapia ADC dirigida para el mieloma múltiple. En particular, CAR T con el antígeno

de maduración de linfocitos B (BCMA) como diana y los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) dirigidos al BCMA han mostrado resultados clínicos positivos en el tratamiento del mieloma múltiple, y se han aprobado diversos fármacos para su comercialización.

[0005] El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), también conocido como CD269 o TNFRSF17, es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y se identificó por primera vez a principios de la década de 1990. BCMA se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos B maduros y las células plasmáticas y es una proteína de referencia para la maduración de los linfocitos B. Estructuralmente, BCMA consiste en tres dominios principales: un segmento extracelular (aa1-54), una región transmembrana (aa55-77) y un segmento intracelular (aa78-184). El factor activador de linfocitos B (BAFF) y el ligando inductor de proliferación (APRIL) son los principales ligandos de BCMA, que transmiten señales de estimulación celular al interactuar con BCMA, activan las rutas NF- κ B y JNK dependientes de TRAF y aumentan la tasa de proliferación y supervivencia de los linfocitos B. El BCMA se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos B maduros y las células plasmáticas, pero apenas se expresa en otras células tisulares. Por otra parte, el BCMA se expresa en gran medida en las células tumorales de la mayoría de los pacientes con mieloma múltiple, por lo que el BCMA es una diana terapéutica ideal para el mieloma múltiple.

[0006] Sin embargo, para pacientes con mieloma múltiple negativo a BCMA o mieloma múltiple con baja expresión de BCMA y pacientes con recaída después de una terapia dirigida a BCMA, existe una necesidad urgente de métodos de tratamiento cada vez más eficaces. Por lo tanto, para el tratamiento del mieloma múltiple, todavía necesitamos encontrar otras nuevas dianas con mayor potencial.

Sumario de la invención

[0007] Para resolver el problema técnico anteriormente mencionado, la presente solicitud proporciona las siguientes soluciones técnicas:

[0008] En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de unión multiespecífica, que comprende:

(a) una primera molécula de unión a antígeno (ABM1) que se une específicamente a un primer antígeno asociado a tumor (TAA1);

(b) una segunda molécula de unión a antígeno (ABM2) que se une específicamente a un segundo antígeno asociado a tumor (TAA2); y

(c) una tercera molécula de unión a antígeno (ABM3) que se une específicamente a un antígeno expresado sobre una célula inmunitaria humana.

5 **[0009]** En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado, que codifica la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente.

[0010] En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un vector recombinante, que comprende el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente.

10 **[0011]** En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora, que comprende el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente o el vector recombinante mencionado anteriormente.

[0012] En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar una molécula de unión multiespecífica, que comprende: cultivar la célula
15 hospedadora mencionada anteriormente en condiciones apropiadas y aislar la molécula de unión multiespecífica.

[0013] En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica, que comprende la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente, el vector
20 recombinante mencionado anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente o un producto preparado de acuerdo con el método mencionado anteriormente, y uno o más vehículos, diluyentes, tampones o excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0014] En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para
25 activar linfocitos T, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica o composición farmacéutica mencionadas anteriormente.

[0015] En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado
30 anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente, un producto preparado mediante el método mencionado anteriormente o la composición farmacéutica mencionada anteriormente, para su uso en la preparación de un fármaco para prevenir y/o tratar cánceres, o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres.

[0016] En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir cánceres, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente, un producto preparado mediante el método mencionado anteriormente o la composición farmacéutica mencionada anteriormente.

[0017] Efectos beneficiosos: el desarrollo de anticuerpos multiespecíficos de doble diana que se dirigen a GPRC5D y BCMA y productos biológicos relacionados tiene la ventaja de cubrir más poblaciones con tumores, posiblemente brindando una eliminación más completa del tumor y retrasando su recurrencia, y tiene grandes necesidades clínicas potenciales.

Breve descripción de las figuras

[0018] La FIG. 1 muestra los diagramas esquemáticos de la estructura de las moléculas de anticuerpos trispecíficos y las moléculas de control positivo y negativo.

[0019] La FIG. 2A muestra el resultado de detección de FACS de una línea celular de transformación estable CHOK1 que expresa la proteína GPRC5D humana.

[0020] La FIG. 2B muestra el resultado de detección de FACS de una línea celular de transformación estable CHOK1 que expresa la proteína GPRC5D de mono.

[0021] La FIG. 3 muestra el resultado de FACS de la cantidad de expresión de células Flp-inCHO-BCMA humanas.

[0022] La FIG. 4A muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos trispecíficos contra la proteína BCMA-his humana mediante ELISA.

[0023] La FIG. 4B muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos trispecíficos contra la proteína BCMA-his de mono mediante ELISA.

[0024] La FIG. 5A muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos trispecíficos contra células CHOK1-GPRC5D humanas mediante ELISA basado en células.

[0025] La FIG. 5B muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos trispecíficos contra células CHOK1-GPRC5D de mono mediante ELISA basado en células.

[0026] La FIG. 6A muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos trispecíficos contra la proteína CD3e/d-his humana mediante ELISA.

[0027] La FIG. 6B muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra la proteína CD3e-his humana mediante ELISA.

[0028] La FIG. 7 muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células Flp-inCHO-BCMA humanas mediante FACS.

5 **[0029]** La FIG. 8 muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células CHOK1-GPRC5D humanas mediante FACS.

[0030] La FIG. 9 muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células H929 mediante FACS.

10 **[0031]** La FIG. 10 muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células Jurkat mediante FACS.

[0032] La FIG. 11A muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra PBMC humanas mediante FACS.

[0033] La FIG. 11B muestra la detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra PBMC de mono mediante FACS.

15 **[0034]** La FIG. 12A muestra la actividad de activación de anticuerpos triespecíficos contra células Jurkat-NFAT-NanoLuc bajo la mediación de células H929.

[0035] La FIG. 12B muestra la actividad de activación de anticuerpos triespecíficos contra células Jurkat-NFAT-NanoLuc bajo la mediación de células K562.

20 **[0036]** La FIG. 13 muestra el efecto de destrucción de los linfocitos T sobre células H929-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0037] La FIG. 14A muestra la liberación de la citocina TNF α cuando los linfocitos T destruyen H929-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0038] La FIG. 14B muestra la liberación de la citocina IFN γ cuando los linfocitos T destruyen H929-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

25 **[0039]** La FIG. 15 muestra el efecto de destrucción de los linfocitos T sobre células RPMI8226-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0040] La FIG. 16A muestra la liberación de la citocina TNF α cuando los linfocitos T destruyen RPMI8226-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

30 **[0041]** La FIG. 16B muestra la liberación de la citocina IFN γ cuando los linfocitos T destruyen RPMI8226-Luc bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0042] La FIG. 17 muestra el efecto de destrucción de los linfocitos T sobre células Molp-8-Luc o Molp-8 bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0043] La FIG. 18A muestra la liberación de la citocina TNF α cuando los linfocitos T destruyen Molp-8-Luc o Molp-8 bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

[0044] La FIG. 18B muestra la liberación de la citocina IFN γ cuando los linfocitos T destruyen Molp-8-Luc o Molp-8 bajo la mediación de anticuerpos triespecíficos.

5

Definición y descripción de la terminología

[0045] Salvo que se defina lo contrario en la presente divulgación, los términos científicos y técnicos relacionados con la presente divulgación tendrán los significados que entiende un experto habitual en la materia.

10 [0046] Además, salvo que se especifique lo contrario en el presente documento, los términos en forma singular incluidos en el presente documento incluirán aquellos en forma plural y los términos en forma plural incluirán aquellos en forma singular. Más específicamente, como se usa en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/uno/una" y "esto/este/esta" incluyen referentes plurales, salvo que
15 se especifique claramente lo contrario.

[0047] Los términos "incluye", "comprende" y "tiene" se usan indistintamente en el presente documento y pretenden indicar la inclusividad de la solución, lo que significa que la solución puede tener otros elementos además de los enumerados. Adicionalmente, debe entenderse que la descripción de "incluye", "comprende" y "tiene" como se usan en
20 el presente documento también proporcionan la solución de "consiste en".

[0048] El término "y/o" como se usa en el presente documento incluye los significados de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de elementos vinculados por el término".

[0049] El término "BCMA" en el presente documento es el nombre abreviado del
25 antígeno de maduración de linfocitos B, que es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. El BCMA se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos B tardíos, las células plasmáticas proliferativas de vida corta y las células plasmáticas de vida larga y no se expresa en linfocitos B vírgenes, células madre hematopoyéticas positivas para CD34 y otras células de tejido normales, pero se expresa
30 altamente en las células MM. BCMA juega un papel clave en la supervivencia, la proliferación, la metástasis y la resistencia a fármacos de las células MM mediante la mediación de rutas de señalización descendentes, siendo de esta manera un antígeno

diana ideal para el tratamiento del MM. Las secuencias de BCMA humanas ilustrativas pueden verse en el N.º de Registro de Proteínas de GenBank: NP_001183.2.

[0050] El término "GPRC5D" en el presente documento se refiere al miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a proteína G, que es un receptor huérfano y es una proteína siete transmembrana. GPRC5D se expresa en gran medida en la superficie de las células de mieloma múltiple primarias, mientras que su expresión en los tejidos normales se limita al área del folículo piloso. Los estudios han demostrado que el 65 % de los pacientes con mieloma múltiple tienen un umbral de expresión de GPRC5D que excede el 50 %. Con esta característica, GPRC5D se ha convertido en una diana potencial para el tratamiento del MM. Las secuencias de GPRC5D humanas ilustrativas pueden verse en el N.º de Registro de Proteínas de GenBank: NP_061124.1.

[0051] El término "CD3" en el presente documento se refiere a un antígeno que es una porción de un receptor de linfocitos T (TCR) multimolecular en un linfocito T y consiste en un homodímero o heterodímero formado por dos de las siguientes cuatro cadenas de receptores: CD3ε, CD3δ, CD3ζ y CD3γ. El CD3-ε humano (hCD3ε) comprende UniProtKB/Swiss-Prot: la secuencia de aminoácidos en P07766.2. El CD3-δ humano (hCD3δ) comprende UniProtKB/Swiss-Prot: la secuencia de aminoácidos en P04234.1. Por lo tanto, el "CD3" se refiere al CD3 humano, salvo que se indique claramente que proviene de una especie no humana, tal como "CD3 de ratón" y "CD3 de mono".

[0052] El término "antígeno asociado a tumor" o "TAA" en el presente documento se refiere a una molécula (normalmente una proteína, un carbohidrato, un lípido o algunas combinaciones de los mismos) expresado completamente o como un fragmento (tal como MHC/péptido) en la superficie de los linfocitos B cancerosos, y puede usarse para dirigir preferentemente un agente farmacológico contra linfocitos B cancerosos. Como se usa en el presente documento, la expresión "linfocitos B cancerosos" se refiere a linfocitos B que están experimentando o han experimentado una proliferación descontrolada. En algunos ejemplos, TAA es un marcador expresado tanto por células normales como por células cancerosas, tal como un marcador de linaje, tal como CD19 en linfocitos B. En algunos casos, TAA es una molécula de superficie de los linfocitos B que se sobreexpresa en los linfocitos B cancerosos en comparación con los linfocitos B normales, tal como sobreexpresado en 1 vez, 2 veces, 3 veces o más veces en comparación con los linfocitos B normales, por ejemplo, BCMA y GPRC5D que tienen una expresión mucho mayor en

los linfocitos B cancerosos que en los tejidos normales. En algunos ejemplos, TAA es una molécula de la superficie celular que se sintetiza incorrectamente en los linfocitos B cancerosos, por ejemplo, una molécula que contiene una eliminación, una adición o una mutación en comparación con una molécula expresada en linfocitos B normales. En algunos ejemplos, TAA solo se expresa completamente o como un fragmento (tal como MHC/péptido) en la superficie celular de los linfocitos B cancerosos y no se sintetiza ni se expresa en la superficie de células normales. Por lo tanto, el término "TAA" cubre los antígenos de linfocitos B específicos de las células cancerosas, a veces denominado "antígeno tumoral específico" (TSA) en la técnica.

[0053] La expresión "unirse específicamente" en el presente documento significa que una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) generalmente se une específicamente a un antígeno y sustancialmente al mismo antígeno con una alta afinidad, pero no se une a un antígeno no relacionado con alta afinidad. La afinidad generalmente se refleja en la constante de disociación de equilibrio (KD), donde un KD más bajo indica mayor afinidad. Tomando un anticuerpo como un ejemplo, una alta afinidad generalmente significa tener una KD de aproximadamente 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, aproximadamente 10^{-8} M o menos o aproximadamente 10^{-9} M o menos. KD se calcula como sigue: $KD = K_d/K_a$, donde K_d representa la tasa de disociación y K_a representa la tasa de unión. La constante de disociación de equilibrio KD puede medirse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore) o ensayo de diálisis de equilibrio.

[0054] La expresión "molécula de unión a antígeno" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a una molécula que se une específicamente a un antígeno. A modo de ejemplo, la molécula de unión a antígeno incluye, pero no se limita a, un anticuerpo o un mimético de anticuerpo. El "anticuerpo mimético" se refiere a un compuesto orgánico o un dominio de unión que puede unirse específicamente a un antígeno, pero no está relacionado estructuralmente con un anticuerpo. A modo de ejemplo, el anticuerpo mimético incluye, pero no se limita a, aficuerpo, afitina, afilina, una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un aptámero de ácido nucleico o un péptido de dominio tipo Kunitz.

[0055] El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a un polipéptido o una combinación de polipéptidos que comprenden secuencias suficientes de una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina

y/o secuencias suficientes de una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina para poder unirse específicamente a un antígeno. El "anticuerpo" en el presente documento abarca diversas formas y diversas estructuras siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. El "anticuerpo" en el presente documento incluye un andamio de proteína alternativo o un andamio artificial con regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas o derivados de CDR. Dichos andamios incluyen andamios derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas, por ejemplo, para estabilizar la estructura tridimensional del anticuerpo y andamios totalmente sintéticos que comprenden, por ejemplo, polímeros biocompatibles.

Véase, por ejemplo, Korndorfer, I. P., Beste, G. y Skerra, A. (2003). *Proteins*, 53, 121–129.; Roque, A. C. A., Lowe, C. R. y Taipa, M. A. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol. Prog.* 20, 639-654 (2004). Dichos andamios también pueden incluir andamios no derivados de anticuerpos, por ejemplo, proteínas de andamiaje conocidas en la técnica que pueden usarse para injertar CDR, incluyendo pero no limitado a tenascina, fibronectina, un aptámero peptídico, etc.

[0056] El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo intacto y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "fracción de unión a antígeno") o cadena simple del mismo. El "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por un enlace disulfuro, o un resto de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consiste en tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consiste en un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones hipervariables conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se intercalan entre regiones más conservadas conocidas como regiones marco (FR). Cada VH y VL consiste en tres CDR y cuatro FR, que están dispuestos en el siguiente orden desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que puede interaccionar con un antígeno. La región constante de un anticuerpo puede mediar la unión de una inmunoglobulina a un tejido o factor hospedador y el tejido o factor hospedador incluye

diversas células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y un primer componente del sistema del complemento clásico (C1q). Dado que la composición de aminoácidos y la secuencia de disposición de la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina son diferentes, la antigenicidad de la inmunoglobulina también es diferente. En consecuencia, "inmunoglobulina" en el presente documento puede dividirse en cinco clases o isotipos de inmunoglobulinas, en concreto IgM, IgD, IgG, IgA y IgE, y las cadenas pesadas correspondientes de las mismas son una cadena μ , una cadena δ , una cadena γ , una cadena α y una cadena ϵ , respectivamente. La misma clase de Ig también puede dividirse en diferentes subclases de acuerdo con las diferencias en la composición de aminoácidos de su región bisagra y el número y posición de los enlaces disulfuro de la cadena pesada. Por ejemplo, IgG puede dividirse en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e IgA puede dividirse en IgA1 e IgA2. Las cadenas ligeras se dividen en una cadena κ o una cadena λ por la diferencia en la región constante. Cada clase de Ig de las cinco clases de Ig puede tener una cadena κ o una cadena λ .

[0057] El "anticuerpo" en el presente documento también incluye un anticuerpo que no comprende cadenas ligeras, por ejemplo, anticuerpos de cadena pesada (HCAb) producidos a partir de camélidos, tales como *Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanicoe* y *Vicugna pacos*, y nuevos receptores de antígenos Ig (IgNAR) encontrados en condriictios tales como los tiburones.

[0058] El término "anticuerpo" en el presente documento puede derivar de cualquier animal, incluyendo pero no limitado a seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos pueden seleccionarse de primates, mamíferos, roedores y vertebrados, tales como camélidos, *Lama glama*, *Lama guanicoe*, *Vicugna pacos*, cabras, conejos, ratones, ratas o condriictios (tales como tiburones).

[0059] La expresión "anticuerpo de cadena pesada" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que carece de las cadenas ligeras de un anticuerpo convencional. El término incluye específicamente, pero no se limita a, un anticuerpo homodimérico que comprende un dominio de unión a antígeno VH y dominios constantes CH2 y CH3 en ausencia de un dominio CH1.

[0060] El término "nanocuerpo" en el presente documento se refiere a un anticuerpo de cadena pesada natural sin cadenas ligeras en camello, etc., y la clonación de su región variable puede obtener un anticuerpo de dominio único, también conocido como VHH (dominio variable de cadena pesada de anticuerpo de cadena pesada), que solo consiste

en una región variable de cadena pesada y es el fragmento de unión a antígeno funcional más pequeño.

[0061] Las expresiones "dominio VHH", "nanocuerpo" y "anticuerpo de dominio único" (sdAb) en el presente documento tienen el mismo significado y se usan indistintamente, y se refieren a un anticuerpo de dominio único que consiste en solo una región variable de cadena pesada construida mediante la clonación de la región variable de un anticuerpo de cadena pesada, que es el fragmento de unión a antígeno más pequeño con funcionalidad completa. Generalmente, un anticuerpo de dominio único que consiste en una sola región variable de cadena pesada se construye obteniendo un anticuerpo de cadena pesada que naturalmente carece de cadenas ligeras y de la región constante 1 de cadena pesada (CH1), y a continuación clonando la región variable de cadena pesada del anticuerpo.

[0062] Las descripciones adicionales del "anticuerpo de cadena pesada", "anticuerpo de dominio único", "dominio VHH" y "nanocuerpo" pueden verse en: Hamers-Casterman *et al.*, Nature. 363, 446-8(1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains.; el artículo de revisión de Muyldermans (J Biotechnol. Junio de 2001; 74(4):277-302. Single domain camel antibodies: current status); y las siguientes solicitudes de patente mencionadas como antecedentes de la técnica generales: documento WO 94/04678, documento WO 95/04079 y documento WO 96/34103; documento WO 94/25591, documento WO 99/37681, documento WO 00/40968, documento WO 00/43507, documento WO 00/65057, documento WO 01/40310, documento WO 01/44301, documento EP 1134231 y documento WO 02/48193; documento WO 97/49805, documento WO 01/21817, documento WO 03/035694, documento WO 03/054016 y documento WO 03/055527; documento WO 03/050531; documento WO 01/90190; documento WO 03/025020; y documento WO 04/041867, documento WO 04/041862, documento WO 04/041865, documento WO 04/041863, documento WO 04/062551, documento WO 05/044858, documento WO 06/40153, documento WO 06/079372, documento WO 06/122786, documento WO 06/122787 y documento WO 06/122825 y otra técnica anterior mencionada en estas solicitudes.

[0063] El término "multiespecífico" en el presente documento se refiere a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de unirse a, por ejemplo, diferentes antígenos o al menos dos epítomos diferentes sobre el mismo antígeno. Por lo tanto, los términos tales como "biespecífico", "triespecífico" y

"tetraespecífico" se refieren al número de epítomos diferentes a los que puede unirse un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico convencional de tipo IgG tiene dos sitios de unión a antígeno idénticos (parátomos) y, por lo tanto, solo puede unirse al mismo epítomo (en lugar de unirse a diferentes epítomos). En cambio, un anticuerpo multiespecífico tiene al menos dos tipos diferentes de parátomos/sitios de unión y, por lo tanto, puede unirse a al menos dos epítomos diferentes. Como se describe en el presente documento, "región determinante de complementariedad" se refiere a un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Adicionalmente, único "específico" puede referirse a una, dos, tres o más regiones determinantes de complementariedad idénticas en un solo anticuerpo (el número real de regiones determinantes de complementariedad/sitios de unión en una sola molécula de anticuerpo se denomina "valencia"). Por ejemplo, un único anticuerpo IgG natural es monoespecífico y bivalente porque tiene dos parátomos idénticos. En consecuencia, un anticuerpo multiespecífico comprende al menos dos regiones/sitios de unión determinantes de complementariedad (diferentes). Por lo tanto, la expresión "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene más de un parátomo y tiene la capacidad de unirse a dos o más epítomos diferentes. La expresión "anticuerpo multiespecífico" incluye particularmente el anticuerpo biespecífico como se definió anteriormente y generalmente también incluye una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o un andamio que se une específicamente a tres o más epítomos diferentes, es decir, un anticuerpo que tiene tres o más parátomos/sitios de unión.

[0064] El término "valente" en el presente documento se refiere a la presencia de un número definido de dominios de unión a antígeno en una molécula de unión a anticuerpo/antígeno. Por lo tanto, los términos "trivalente", "tetraivalente", "pentavalente" y "hexavalente" se refieren a la presencia de tres dominios de unión a antígeno, cuatro dominios de unión a antígeno, cinco dominios de unión a antígeno y seis dominios de unión a antígeno en un anticuerpo/una molécula de unión a antígeno, respectivamente.

[0065] El término "trivalente" usado en el presente documento se refiere a una molécula de unión a antígeno que tiene tres dominios de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno multiespecífica de la presente divulgación es trispecífica y se une específicamente a TAA1, TAA2 y CD3. Por lo tanto, la molécula de unión multiespecífica trivalente de la presente divulgación tiene al menos tres dominios de unión a antígeno cada uno de los cuales se une a un antígeno diferente. Los ejemplos de

la molécula de unión multiespecífica trivalente de la presente divulgación se muestran esquemáticamente en la FIG. 1N o 1O.

[0066] El término "tetraivalente" usado en el presente documento se refiere a una molécula de unión a antígeno que tiene cuatro dominios de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno multiespecífica de la presente divulgación es trispecífica y se une específicamente a TAA1, TAA2 y CD3. Por lo tanto, la molécula de unión multiespecífica tetraivalente de la presente divulgación generalmente tiene dos dominios de unión a antígeno que se unen al mismo antígeno (por ejemplo, TAA1 o TAA2) y dos dominios de unión a antígeno que se unen cada uno a un antígeno separado (por ejemplo, CD3 y TAA1 o TAA2). Los ejemplos de la molécula de unión multiespecífica tetraivalente de la presente divulgación se muestran esquemáticamente en las FIG. 1H-1J.

[0067] El término "pentavalente" usado en el presente documento se refiere a una molécula de unión a antígeno que tiene cinco dominios de unión a antígeno. La molécula de unión multiespecífica de la presente divulgación es trispecífica y se une específicamente a TAA1, TAA2 y CD3. Por lo tanto, la molécula de unión multiespecífica pentavalente de la presente divulgación generalmente tiene dos pares de dominios de unión a antígeno que se unen cada uno al mismo antígeno, y un único dominio de unión a antígeno que se une a un tercer antígeno (por ejemplo, CD3). Los ejemplos de la molécula de unión multiespecífica pentavalente de la presente divulgación se muestran esquemáticamente en las FIG. 1K-1M.

[0068] El término "hexavalente" usado en el presente documento se refiere a una molécula de unión a antígeno que tiene seis dominios de unión a antígeno. La molécula de unión multiespecífica de la presente divulgación es trispecífica y se une específicamente a TAA1, TAA2 y CD3. Aunque existen diferentes configuraciones (por ejemplo, tres dominios de unión a antígeno que se unen a TAA1, dos dominios de unión a antígeno que se unen a TAA2 y un dominio de unión a antígeno que se une a CD3, o tres dominios de unión a antígeno que se unen a TAA1, dos dominios de unión a antígeno que se unen a CD3 y un dominio de unión a antígeno que se une a TAA2) se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación, la molécula de unión multiespecífica hexavalente de la presente divulgación generalmente tiene tres pares de dos dominios de unión a antígeno que se unen cada uno al mismo antígeno. Los ejemplos de la molécula

de unión multiespecífica hexavalente de la presente divulgación se muestran esquemáticamente en las FIG. 1A-1G.

[0069] Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo completo" y "anticuerpo intacto" se usan en el presente documento indistintamente y significan que
5 tienen una estructura sustancialmente similar a la de un anticuerpo natural.

[0070] Las expresiones "fragmento de unión a antígeno" y "fragmento de anticuerpo" se usan indistintamente en el presente documento, que no poseen la estructura completa de un anticuerpo intacto y solo comprenden una parte de un anticuerpo intacto o una variante de la parte, en donde la parte del anticuerpo intacto o la
10 variante de la parte tiene la capacidad de unirse a un antígeno. A modo de ejemplo, el "fragmento de unión a antígeno" o "fragmento de anticuerpo" en el presente documento incluye, pero no se limita a, Fab, F(ab')₂, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, scFv, diacuerpo y un anticuerpo de dominio único.

[0071] El término "enlazador" en el presente documento se refiere a la unión de
15 secuencias polipeptídicas para unir un dominio proteico y, generalmente, tiene un cierto grado de flexibilidad. El uso de enlazador no produce la pérdida de la función original del dominio proteico.

[0072] La expresión "anticuerpo quimérico" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia variable de una inmunoglobulina de un organismo
20 fuente (tal como una rata, un ratón, un conejo o una *Vicugna pacos*) y una región constante de una inmunoglobulina de un organismo diferente (tal como ser humano). Los métodos para producir los anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229(4719): 1202-1207. Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies; y Gillies *et al.*, J Immunol Methods. 20 de dic de 1989; 125(1-2):
25 191-202; los documentos anteriores se incorporan como referencia en el presente documento. Véase también la patente US 5807715 A.

[0073] La expresión "anticuerpo humanizado" en el presente documento se refiere a un anticuerpo no humano que se ha modificado por ingeniería genética, con secuencias de aminoácidos modificadas para mejorar la homología con las secuencias de un anticuerpo humano. En términos generales, la totalidad o parte de las regiones CDR de
30 un anticuerpo humanizado provienen de un anticuerpo no humano (un anticuerpo donante) y la totalidad o parte de las regiones no CDR (por ejemplo, una región variable FR y/o una región constante) provienen de una inmunoglobulina humana (un anticuerpo

receptor). Un anticuerpo humanizado generalmente conserva o conserva parcialmente las propiedades esperadas de un anticuerpo donante, incluyendo pero no limitado a, especificidad antigénica, afinidad, reactividad, capacidad de mejorar la actividad de las células inmunitarias o capacidad de mejorar la respuesta inmunitaria, etc.

5 **[0074]** La expresión "anticuerpo completamente humano" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las cuales tanto las FR como las CDR proceden de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo comprende una región constante, la región constante también proviene de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. El "anticuerpo completamente humano" en el presente documento puede incluir
10 restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el "anticuerpo completamente humano" en el presente documento no incluye anticuerpos en los cuales
15 se hayan injertado secuencias CDR obtenidas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, un ratón) en secuencias marco humanas.

[0075] La expresión "región variable" en el presente documento se refiere a una región en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo que está implicada en permitir que el anticuerpo se una a un antígeno. La "región variable de cadena pesada", "VH" y
20 "HCVR" se usan indistintamente, y la "región variable de cadena ligera", "VL" y "LCVR" se usan indistintamente. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras similares, y cada región comprende cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6ª edición, W.H.Freeman and Co., p. 91 (2007). Una sola VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad
25 de unión a antígeno.

[0076] Las expresiones "región determinante de complementariedad" y "CDR" se usan en el presente documento indistintamente y generalmente se refieren a regiones hipervariables (HVR) que se encuentran en los dominios variables de cadena ligera y
30 pesada. Las porciones más conservadas en los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Como se entiende en la técnica, las posiciones de aminoácidos que representan las regiones hipervariables de un anticuerpo pueden variar de acuerdo con el contexto y diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de

dominios variables pueden considerarse posiciones hipervariables heterocigotas porque estas posiciones pueden considerarse dentro de las regiones hipervariables bajo un conjunto de criterios (tales como IMGT o KABAT) pero fuera de las regiones hipervariables bajo un conjunto diferente de criterios (tales como KABAT o IMGT). Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en las regiones hipervariables extendidas. La presente divulgación incluye un anticuerpo que comprende modificaciones en estas posiciones hipervariables heterocigotas. La región variable de cadena pesada CDR puede abreviarse como HCDR, y la región variable de cadena ligera CDR puede abreviarse como LCDR. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden respectivamente cuatro regiones de estructura predominantemente en una configuración de lámina, que están enlazadas por tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) que forman un bucle que une la estructura de la lámina y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la lámina. Las CDR de cada cadena se mantienen estrechamente unidas en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 por la región FR, y junto con las CDR de otras cadenas de anticuerpos, contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

[0077] Las "CDR" en el presente documento pueden marcarse y definirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado al sistema de numeración Kabat, el sistema de numeración Chothia o el sistema de numeración IMGT.

Los sitios web de herramientas usados incluyen, pero no se limitan a, el sitio web AbRSA (<http://cao.labshare.cn/AbRSA/cdrs.php>), el sitio web abYsis (www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi) y el sitio web IMGT (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi#results>). Las CDR en el presente documento incluyen superposiciones y subconjuntos de restos de aminoácidos definidos de diferentes maneras.

[0078] La expresión "sistema de numeración de Kabat" en el presente documento se refiere generalmente al sistema de alineación y numeración de inmunoglobulinas propuesto por Elvin A. Kabat (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991).

[0079] La expresión "sistema de numeración de Chothia" en el presente documento generalmente se refiere al sistema de numeración de inmunoglobulina propuesto por Chothia *et al.*, que es una regla clásica para identificar los límites de las regiones CDR

en función de la ubicación de las regiones de bucle estructural (véase, por ejemplo, Chothia, C. y Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *Journal of molecular biology*, 196(4), 901-917.).

[0080] La expresión "sistema de numeración IMGT" en el presente documento se refiere generalmente al sistema de numeración basado en el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT) iniciado por Lefranc *et al.*, véase Lefranc, M. P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., ... y Lefranc, G. (2003). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(1), 55-77.

[0081] La expresión "región constante de cadena pesada" en el presente documento se refiere a la porción carboxilo terminal de la cadena pesada de un anticuerpo, que no está directamente implicada en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero exhibe funciones efectoras, tal como interacción con los receptores Fc, y tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con el dominio variable del anticuerpo. La "región constante de cadena pesada" puede seleccionarse de un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento de los mismos. La "región constante de cadena pesada" incluye la "región constante de cadena pesada de longitud completa" y el "fragmento de región constante de cadena pesada", la primera tiene una estructura sustancialmente similar a la de una región constante de anticuerpo natural, mientras que la última solo incluye "una porción de la región constante de la cadena pesada de longitud completa". A modo de ejemplo, una "región constante de cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" típica consiste en dominio CH1-región bisagra-dominio CH2-dominio CH3; cuando el anticuerpo es IgE, también incluye un dominio CH4; y cuando el anticuerpo es un anticuerpo de cadena pesada, no incluye el dominio CH1. A modo de ejemplo, un "fragmento de región constante de cadena pesada" típico puede seleccionarse de Fc o un dominio CH3.

[0082] La expresión "región constante de cadena ligera" en el presente documento se refiere a la porción carboxilo terminal de la cadena ligera de un anticuerpo, que no está directamente implicada en la unión del anticuerpo a un antígeno. La región constante de la cadena ligera puede seleccionarse de un dominio κ constante o un dominio λ constante.

[0083] La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye una región Fc de secuencia nativa y una región Fc variante. A modo de ejemplo, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana puede extenderse desde Cys226 o Pro230 hasta el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, un anticuerpo generado a partir de una célula hospedadora puede sufrir una escisión postraducciona mediante la cual uno o más, particularmente uno o dos aminoácidos se separan del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa, el anticuerpo generado a partir de una célula hospedadora puede incluir la cadena pesada de longitud completa o una variante de escisión de la cadena pesada de longitud completa. Este puede ser el caso cuando los dos últimos aminoácidos C-terminales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice Kabat EU). Por lo tanto, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina C-terminal (Gly446) y la lisina (Lys447) de la región Fc pueden o no estar presentes. Normalmente, una región Fc de IgG comprende dominios CH2 de IgG y CH3 de IgG y, opcionalmente, según esto, la región Fc de IgG también puede comprender una región bisagra completa o parcial, pero no comprende un dominio CH1. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana generalmente se extiende desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 231 hasta un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 340. En una realización, una cadena de carbohidrato se fija al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa un dominio CH2 variante. El "dominio CH3" comprende el tramo de restos en el extremo C del dominio CH2 en la región Fc (es decir, desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 341 hasta un aminoácido aproximadamente en la posición 447 de IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 que tiene una "perilla" introducida en una cadena del mismo y un "orificio" introducido correspondientemente en la otra cadena del mismo; véase la Patente de EE.UU. N.º 5.821.333, que se incorpora expresamente como referencia en el presente documento. Como se describe en el presente documento, estos dominios CH3 variantes pueden usarse para facilitar la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpos no idénticas.

[0084] Salvo que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en una región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también conocido como el índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición.

5 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

[0085] La expresión "variante de Fc" en el presente documento se refiere a cambios en la estructura o función de Fc provocados por una o más mutaciones de sustitución, inserción o eliminación en posiciones apropiadas en el Fc. La "interacción entre variantes de Fc" se refiere al efecto de relleno de espacio, dirección electrostática, efecto de unión de hidrógeno, efecto hidrófobo, etc. formados entre variantes de Fc que se han sometido a un diseño de mutación. La interacción entre variantes de Fc contribuye a la formación de una proteína heterodimérica estable. Un diseño de mutación preferido es un diseño de mutación en forma de "perilla en orificio (KIH, por sus siglas en inglés)".

[0086] La técnica de diseño de mutaciones de variantes de Fc se ha usado ampliamente en el campo para preparar anticuerpos biespecíficos o formas de proteína de fusión Fc heterodimérica. Los ejemplos representativos incluyen una forma de "perilla en orificio" propuesta por Cater *et al.* (Ridgway, J. B., Presta, L. G., y Carter, P. (1996). 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Engineering, Design and Selection, 9(7), 617-621.); una forma heterodimérica que contiene Fc formada mediante dirección electrostática por el técnico de Amgen (documento US 20100286374 A1); una forma heterodimérica formada por intercambio de cadenas IgG/IgA (SEEDcuerpos) propuesta por Jonathan H. Davis *et al.* (Davis, J. H., Aperlo, C., Li, Y., Kurosawa, E., Lan, Y., Lo, K. M., y Huston, J. S. (2010). SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analog platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. Protein Engineering, Design & Selection, 23(4), 195-202.); una molécula biespecífica formada por la técnica de la plataforma DuoBody de Genmab (Gramer, M. J., van den Bremer, E. T., van Kampen, M. D., Kundu, A., Kopfmann, P., Etter, E., ... y Parren, P. W. (2013, noviembre). Production of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange: scalability from bench to large-scale manufacturing by application of standard approaches. In MAbs (Vol. 5, N.º 6, pp. 962-973). Taylor y Francis.); una forma de proteína heterodimérica formada mediante la combinación de cálculos estructurales, mutaciones de aminoácido Fc y diferentes modos

de acción del técnico en Xencorto (Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H. T., Jacinto, J., Eivazi, A., ... y Lazar, G. A. (2011, noviembre). A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. In MABs (Vol. 3, N.º 6, pp. 546-557). Taylor y Francis.); una
5 forma de proteína heterodimérica obtenida mediante el método de modificación de Fc basado en red de carga de Alphamab Oncology (documento CN 201110459100.7); y otros métodos de ingeniería genética para formar proteínas funcionales heterodiméricas basadas en cambios de aminoácidos Fc o medios de modificación funcional. La estructura de Perilla/Orificio en los fragmentos de la variante Fc de la presente
10 divulgación significa que los dos fragmentos Fc están mutados respectivamente y pueden combinarse en una forma de "Perilla en orificio" después de las mutaciones. Preferentemente, las regiones Fc están sujetas a modificación de mutación de sitio usando el modelo "Knob-into-hole" de Cater *et al.*, de tal manera que la primera variante Fc obtenida y la segunda variante Fc obtenidas puedan combinarse entre sí en una forma
15 de "perilla en orificio" para formar un heterodímero. La selección de regiones Fc de inmunoglobulina particulares de clases y subclases de inmunoglobulina particulares está dentro del alcance de los expertos en la materia. Las regiones Fc de los anticuerpos humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se prefieren y la región Fc del anticuerpo humano IgG1 es más preferida. Se selecciona aleatoriamente la primera variante Fc o la segunda
20 variante Fc para la mutación de perilla y la otra para la mutación de orificio.

[0087] La expresión "función efectora" en el presente documento se refiere a la actividad de una molécula de anticuerpo, que está mediada por la unión del dominio del anticuerpo en lugar del dominio de unión a antígeno, habitualmente mediada por la unión de una molécula efectora. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas
25 por el complemento, que están mediadas por, por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento al anticuerpo. La activación de un complemento es importante en el condicionamiento y la lisis de patógenos celulares. La activación de un complemento también estimula la respuesta inflamatoria y puede participar en la respuesta de hipersensibilidad autoinmunitaria. Las funciones efectoras también incluyen funciones
30 efectoras mediadas por el receptor Fc (FcR), que puede desencadenarse por la unión del dominio constante del anticuerpo al receptor Fc (FcR). La unión de anticuerpos a los receptores Fc en la superficie celular desencadena muchas respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo la fagocitosis y la destrucción de partículas

recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas con anticuerpo por células eliminadoras (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina. Las funciones efectoras de un anticuerpo pueden cambiarse mediante, por ejemplo, la mejora o la disminución de la afinidad del anticuerpo hacia una molécula efectora como un receptor Fc o un componente del complemento. Generalmente, la afinidad de unión se cambiará modificando el sitio de unión de una molécula efectora y, en este caso, es apropiado localizar el sitio de interés y modificar al menos parte del sitio de manera apropiada. También se supone que los cambios en los sitios de unión de un anticuerpo contra una molécula efectora no necesitan cambiar significativamente la afinidad de unión general, pero puede cambiar la geometría de la interacción, dando como resultado un mecanismo efector no válido, como en la unión improductiva. Se supone además que las funciones efectoras también pueden cambiarse modificando sitios que no están directamente implicados en la unión de moléculas efectoras pero que de otro modo participan en las funciones efectoras.

[0088] La expresión "aminoácido conservativo" en el presente documento generalmente se refiere a aminoácidos que pertenecen a la misma clase o tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de la cadena lateral, hidrofobicidad, hidrofiliidad, conformación y rigidez de la cadena principal). A modo de ejemplo, los siguientes aminoácidos en cada grupo son restos de aminoácidos conservativos de los demás y una sustitución de restos de aminoácidos en el grupo es una sustitución de aminoácidos conservativos:

- 1) Alanina (A), Serina (S) y Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N) y Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K) e Histidina (H);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M) y Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y) y Triptófano (W).

[0089] El término "identidad" en el presente documento puede calcularse mediante el siguiente método. Para determinar el porcentaje de "identidad" de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse espacios en una o ambas de la

primera y segunda secuencia de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos para una alineación óptima o pueden descartarse secuencias no homólogas para fines de comparación). Los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando la
5 posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que aquel de la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias variará con las posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios que deben introducirse para alinear de forma óptima las dos
10 secuencias y la longitud de cada espacio.

[0090] La comparación de secuencias y el cálculo del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman y Wunsch en el programa GAP que se ha integrado en el paquete
15 de software GCG (disponible en www.gcg.com) y usando la matriz Blossum 62 o la matriz PAM250, con una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Para otro ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com) y usando la matriz NWSgapdna.CMP,
20 con una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y un conjunto de parámetros que debe usarse a menos que se indique lo contrario) es la matriz de puntuación Blossum62 con una penalización de hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por desplazamiento de marco de 5. El
25 porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos también puede determinarse usando la tabla de resto ponderado PAM120, con una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4, y usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0).

[0091] Adicionalmente o como alternativa, las secuencias de ácido nucleico y de proteínas de la presente divulgación pueden usarse además como "secuencias de consulta" para realizar búsquedas frente a bases de datos públicas, por ejemplo, para
30 identificar otras secuencias de miembros de la familia o secuencias relacionadas. Por

ejemplo, los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 pueden usarse para realizar dichas búsquedas. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, con puntuación = 100 y longitud de palabra = 12, para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, con puntuación = 50 y longitud de palabra = 3, para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la presente divulgación. Para obtener resultados de alineación con huecos con fines comparativos, puede usarse gapped Blast como se describe en Altschul *et al.*, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, 25 (17), 3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas correspondientes (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

[0092] La expresión "ácido nucleico" en el presente documento incluye cualquier compuesto y/o sustancia que comprenda un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido consiste en una base, específicamente una base de purina o pirimidina (es decir, citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) o uracilo (U)), un azúcar (es decir, desoxirribosa o ribosa) y un grupo fosfato. Generalmente, una molécula de ácido nucleico se describe mediante una secuencia de bases, de tal manera que las bases representan la estructura primaria (estructura lineal) de la molécula de ácido nucleico. La secuencia de bases generalmente se expresa como 5' a 3'. En este contexto, el término molécula de ácido nucleico abarca el ácido desoxirribonucleico (ADN), incluyendo por ejemplo el ADN complementario (ADNc) y el ADN genómico, ácido ribonucleico (ARN), especialmente el ARN mensajero (ARNm), formas sintéticas de ADN o ARN, y un polímero que comprende una mezcla de dos o más de estas moléculas. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular. Adicionalmente, la expresión molécula de ácido nucleico incluye tanto la cadena sentido como la cadena antisentido, así como la forma monocatenaria y la forma bicatenaria. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden contener nucleótidos de origen natural o no natural. Los ejemplos de nucleótidos que no se producen de forma natural incluyen bases de nucleótidos modificadas con enlaces de cadena principal de azúcar o fosfato derivatizados o restos modificados químicamente. La molécula de ácido nucleico

también abarca moléculas de ADN y ARN que son adecuadas como vectores para la expresión directa del anticuerpo de la presente divulgación *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, en un hospedador o en un paciente. Dichos vectores de ADN (por ejemplo, ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm) pueden estar modificados o no modificados. Por ejemplo, el ARNm puede modificarse químicamente para mejorar la estabilidad del vector de ARN y/o la expresión de la molécula codificada, de tal manera que el ARNm pueda inyectarse en un sujeto para generar un anticuerpo *in vivo* (véase, por ejemplo, Stadler, C. R., Bähr-Mahmud, H., Celik, L., Hebich, B., Roth, A. S., Roth, R. P., ... y Sahin, U. (2017). Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies. Nature medicine, 23 (7), 815-817 o el documento EP 2101823 B1).

[0093] La expresión ácido nucleico "aislado" en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de los componentes del entorno natural de la misma. El ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenido en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero que está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica distinta de la ubicación cromosómica natural de la misma.

[0094] El término "vector" en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de amplificar otro ácido nucleico con el que está enlazado. El término incluye un vector que tiene una estructura de ácido nucleico autorreplicante y un vector que está integrado en el genoma de una célula hospedadora en la cual se ha introducido el vector. Determinados vectores pueden dirigir la expresión del ácido nucleico al que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

[0095] La expresión "célula hospedadora" en el presente documento se refiere a una célula en la cual se introduce un ácido nucleico extraño, incluyendo la descendencia de una célula tal. La célula hospedadora incluye un "transformante" y una "célula transformada" que incluyen una célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma, independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser idéntica a la célula parental en cuanto a contenido de ácido nucleico y puede contener una mutación. Las descendencias mutantes con la misma función o actividad biológica que las examinadas o seleccionadas en las células inicialmente transformadas se incluyen en el presente documento.

[0096] La expresión "composición farmacéutica" en el presente documento se refiere a una preparación que está presente en una forma que permite que los principios activos contenidos en ella sean biológicamente eficaces y no contiene ingredientes adicionales que serían inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administra la composición farmacéutica.

[0097] La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" en el presente documento incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, materiales de recubrimiento, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, disgregantes, lubricantes, edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, etc. y una combinación de los mismos, que son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. MackPrinting Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto en casos de incompatibilidad con el principio activo, se contempla cualquier vehículo convencional para su uso en una composición terapéutica o farmacéutica.

[0098] El término "tratamiento" en el presente documento se refiere al tratamiento quirúrgico o terapéutico, cuyo fin es prevenir y ralentizar (reducir) un cambio fisiológico o patología no deseada en un sujeto que se está tratando, tal como cánceres y tumores. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, cuadro clínico estabilizado (es decir, no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o alivio del cuadro clínico y remisión (ya sea respuesta parcial o respuesta completa), ya sea detectable o indetectable. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen sujetos que ya padecen una afección o enfermedad, sujetos que son propensos a una afección o enfermedad o sujetos que tienen la intención de prevenir una afección o enfermedad. Cuando se hace referencia a términos tales como ralentización, alivio, disminución, paliación y remisión, el significado de eliminación, desaparición, no aparición, etc. también está incluido.

[0099] El término "sujeto" en el presente documento se refiere a un organismo que recibe tratamiento para una enfermedad o afección particular como se describe en el presente documento. A modo de ejemplo, un "sujeto" incluye un mamífero, tal como un

ser humano, un primate (por ejemplo, mono) o un mamífero no primate, que recibe tratamiento para una enfermedad o afección.

[0100] La expresión "cantidad eficaz" en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico eficaz para prevenir o aliviar una enfermedad o una afección o la progresión de la enfermedad cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a una célula, tejido o sujeto. La "cantidad eficaz" también se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para aliviar los síntomas, por ejemplo, tratar, curar, prevenir o aliviar las afecciones médicas asociadas, o aumentar la velocidad de tratamiento, curación, prevención o alivio de estas afecciones. Cuando un principio activo se administra a un individuo solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere al ingrediente solo. Cuando se usa una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a las cantidades combinadas de los principios activos que producen un efecto terapéutico, ya se administren en combinación, de forma secuencial o simultánea.

[0101] El término "cáncer" en el presente documento se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen tanto los cánceres benignos como los malignos. El término "tumor" o "neoplasia" en el presente documento se refiere a todos los crecimientos celulares neoplásicos y a la proliferación, ya sean maligna o benigna, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer" y "tumor" no son mutuamente excluyentes cuando se hace referencia a ellos en el presente documento.

[0102] El término "CE50" en el presente documento se refiere a la concentración eficaz semimáxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico. CE50 representa esencialmente la concentración de un anticuerpo en la que se observa el 50 % de su efecto máximo y que puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica.

Descripción detallada de las realizaciones

[0103] GPRC5D es un receptor acoplado a proteína G familia C grupo 5 miembro D, que es un receptor huérfano y es una proteína siete transmembrana. GPRC5D es una nueva diana específica para el mieloma múltiple después de BCMA. Se ha descubierto en estudios de perfiles de expresión tisular que GPRC5D se expresa de forma específica

y elevada en las células plasmáticas de mieloma múltiple, mientras que tiene una baja expresión en los tejidos normales, que se limita a las regiones del folículo piloso con privilegio inmunológico. Por otra parte, la expresión de GPRC5D no coincide con la de BCMA. Para los modelos de recurrencia tumoral con pérdida de BCMA, GPRC5D CAR-T todavía tiene un efecto terapéutico, superando el escape tumoral. La molécula CD3 es un marcador importante de los linfocitos T y es una porción del receptor de linfocitos T (TCR), que puede inducir la activación de los linfocitos T y está relacionado con la inmunidad tumoral.

[0104] La presente divulgación proporciona una nueva molécula de unión a antígeno multiespecífica que se dirige a los antígenos tumorales BCMA, GPRC5D y linfocito T (CD3), en que se unen las dos dianas diferentes del mieloma múltiple mientras se induce al linfocito T a participar en la destrucción del tumor para mejorar el efecto de destrucción del tumor, proporcionando de esta manera un nuevo método de tratamiento de tumores.

[0105] La presente divulgación proporciona además un fragmento de ácido nucleico que codifica un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), GPRC5D y linfocito T, un vector, una célula hospedadora, una célula efectora inmunitaria, un método de preparación, una composición farmacéutica, un uso farmacéutico y un método para tratar tumores o cánceres (por ejemplo, linfoma de linfocitos B o mieloma múltiple).

[0106] En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de unión multiespecífica, que comprende:

(a) una primera molécula de unión a antígeno (ABM1) que se une específicamente a un primer antígeno asociado a tumor (TAA1);

(b) una segunda molécula de unión a antígeno (ABM2) que se une específicamente a un segundo antígeno asociado a tumor (TAA2); y

(c) una tercera molécula de unión a antígeno (ABM3) que se une específicamente a un antígeno expresado sobre una célula inmunitaria humana.

[0107] En algunas realizaciones, el TAA1 y/o el TAA2 se expresan en un linfocito B canceroso.

[0108] En algunas realizaciones, el linfocito B canceroso es una célula plasmática derivada o linfocito B derivado.

[0109] En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona de un linfocito T, una célula NK o un macrófago.

[0110] En algunas realizaciones, el TAA1 y el TAA2 se seleccionan independientemente de BCMA y GPRC5D y/o el antígeno expresado en la célula inmunitaria es CD3.

[0111] En algunas realizaciones, el ABM1, ABM2 y ABM3 pueden seleccionarse cada uno independientemente de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, un nanocuerpo o VHH.

[0112] En algunas realizaciones, la molécula de unión multiespecífica comprende cuatro cadenas polipeptídicas: una primera cadena pesada, una primera cadena ligera, una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera.

[0113] En algunas realizaciones específicas, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada son iguales y tienen la estructura que se muestra a continuación:

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

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

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

30 **[0114]** En algunas realizaciones específicas, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada son diferentes y tienen la estructura que se muestra a continuación:

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

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

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

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

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

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

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

en donde VH_a y VL_a son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a GPRC5D, respectivamente; VHH_b es un nanocuerpo que se une específicamente a BCMA, VH_b y VL_b son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a
20 BCMA, respectivamente; VH_{CD3} y VL_{CD3} son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a CD3, respectivamente; Fc1 y Fc2 son cada uno una región Fc de cualquier anticuerpo; y L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son los mismos o diferentes enlazadores, respectivamente.

[0115] En algunas realizaciones, la molécula de unión multiespecífica comprende
25 tres cadenas polipeptídicas: una primera cadena pesada, una segunda cadena pesada y una cadena ligera, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada tienen la estructura que se muestra a continuación:

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

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

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

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

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

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

[0116] En algunas realizaciones, Fc1 y Fc2 de la molécula de unión multiespecífica son diferentes, en donde Fc1 es perilla-Fc y Fc2 es orificio-Fc; o, Fc1 es orificio-Fc y Fc2 es perilla-Fc; y, preferentemente, Fc1 y Fc2 son regiones Fc de IgG1 o IgG4.

[0117] En algunas realizaciones específicas, en donde la perilla-Fc comprende una mutación T366W y/o el orificio-Fc comprende una mutación T366S, L368A y/o Y407V.

[0118] En algunas realizaciones, el ABM3 en la molécula de unión multiespecífica es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada: (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 54-56 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 54-56; y (b) la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 51-53 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 51-53.

[0119] En algunas realizaciones específicas, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 10 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID

NO: 9 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 9.

[0120] En algunas realizaciones específicas, el ABM3 es scFv.

[0121] En algunas realizaciones, los TAA1 y TAA2 en la molécula de unión multiespecífica se seleccionan del siguiente grupo: (a) TAA1 es BCMA y TAA2 es GPRC5D; o (b) TAA1 es GPRC5D y TAA2 es BCMA.

[0122] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a GPRC5D en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo, en donde (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, el LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 42-44 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 42-44, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 39-41 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 39-41; o (b) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, el LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48-50 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 48-50, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 45-47 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 45-47.

[0123] En algunas realizaciones específicas, en donde:

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

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

[0124] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a GPRC5D en la molécula de unión multiespecífica es Fab.

[0125] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 27-29 como se muestra en SEQ ID NO: 30-32 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 27-29 o SEQ ID NO: 30-32.

[0126] En algunas realizaciones específicas, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0127] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA es VHH.

[0128] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo: (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 36-38 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 36-38; y (b) la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 33-35 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 33-35.

[0129] En algunas realizaciones específicas, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 4 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 3.

[0130] En algunas realizaciones específicas, la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA es scFv.

[0131] En algunas realizaciones, el ABM1, ABM2 y/o ABM3 es quimérico, humanizado o completamente humanizado.

[0132] En algunas realizaciones, la molécula de unión multiespecífica comprende además un fragmento Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas; y, preferentemente, la molécula de unión multiespecífica comprende un fragmento Fc de IgG1 humana o IgG4 humana.

[0133] En algunas realizaciones específicas, el fragmento Fc de la molécula de unión multiespecífica tiene una mutación de aminoácido que cambia las funciones efectoras; preferentemente, la mutación del aminoácido que cambia las funciones efectoras comprende una mutación S228P, F234A, L234A y/o L235A; y más preferentemente, la mutación de aminoácidos que cambia las funciones efectoras comprende: (a) una mutación L234A y/o L235A de Fc de IgG1; y/o (b) una mutación S228P, F234A y/o L235A de Fc de IgG4.

[0134] En algunas realizaciones, el fragmento Fc de la molécula de unión multiespecífica comprende Fc1 y Fc2 iguales o diferentes.

[0135] En algunas realizaciones específicas, los diferentes Fc1 y Fc2 en la molécula de unión multiespecífica tienen mutaciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización; preferentemente, las mutaciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización comprenden una mutación de perilla en orificio (KIH); y más preferentemente, la mutación de perilla en orificio comprende: (a) una mutación T366W en cualquier región Fc; y (b) una mutación T366S, L368A y/o Y407V en otra región Fc.

[0136] En algunas realizaciones específicas, el Fc1 comprende además una etiqueta His y el Fc2 comprende además una etiqueta Flag; o el Fc1 comprende además una etiqueta Flag y el Fc2 comprende además una etiqueta His.

[0137] En algunas realizaciones, la molécula de unión multiespecífica es trivalente, tetravalente, pentavalente o hexavalente.

[0138] En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado, que codifica la molécula de unión multiespecífica mencionada
5 anteriormente.

[0139] En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un vector recombinante, que comprende el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente.

[0140] En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora, que comprende el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente o el
10 vector recombinante mencionado anteriormente; preferentemente, la célula hospedadora es una célula eucariota o una célula procariota; más preferentemente, la célula hospedadora deriva de una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, *Escherichia coli* y/o *Bacillus subtilis*; y más preferentemente, la célula hospedadora es una célula Expi293.

[0141] En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para
15 preparar una molécula de unión multiespecífica, que comprende: cultivar la célula hospedadora mencionada anteriormente en condiciones apropiadas y aislar la molécula de unión multiespecífica.

[0142] En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona una composición
20 farmacéutica, que comprende la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente, el vector recombinante mencionado anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente o un producto preparado de acuerdo con el método mencionado anteriormente, y uno o más vehículos, diluyentes, tampones o excipientes
25 farmacéuticamente aceptables; más preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico contra el cáncer adicional.

[0143] En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para
30 activar linfocitos T, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica o composición farmacéutica mencionadas anteriormente.

[0144] En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente, un producto preparado

mediante el método mencionado anteriormente o la composición farmacéutica mencionada anteriormente, para su uso en la preparación de un fármaco para prevenir y/o tratar cánceres, o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres.

5 **[0145]** En realizaciones preferidas, el cáncer es linfoma de linfocitos B; y más preferentemente, el linfoma de linfocitos B es mieloma múltiple.

10 **[0146]** En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir cánceres, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica mencionada anteriormente, el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente, la célula hospedadora mencionada anteriormente, un producto preparado mediante el método mencionado anteriormente o la composición farmacéutica mencionada anteriormente.

15 **[0147]** En realizaciones preferidas, el cáncer es linfoma de linfocitos B; y más preferentemente, el linfoma de linfocitos B es mieloma múltiple.

15 **Ejemplos**

20 **[0148]** La presente divulgación se describirá con más detalle a continuación junto con ejemplos específicos, y las ventajas y características de la presente divulgación se harán más claras junto con la descripción. Si no se especifican condiciones específicas en los ejemplos, se siguen las condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por un fabricante. Los reactivos o instrumentos usados en los mismos y para los cuales no se especifican fabricantes son todos productos convencionales que se encuentran disponibles en el mercado.

25 **[0149]** Los ejemplos de la presente divulgación son meramente ilustrativos y no limitan el alcance de la presente divulgación de ninguna manera. Aquellos expertos en la materia deben comprender que los detalles y las formas de las soluciones técnicas de la presente divulgación pueden modificarse o reemplazarse sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente divulgación, pero todas estas modificaciones y sustituciones caen dentro del alcance de protección de la presente divulgación.

30 **Ejemplo 1 Construcción de la molécula de anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3**

35 **[0150]** Después de una serie de experimentos tal como inmunización animal, secuenciación y humanización, se obtuvieron anticuerpos anti-BCMA mejor humanizados (BCMA-VHH01, BCMA-VHH02 y BCMA-Hab01), anticuerpos

específicos anti-GPRC5D humanizados (GPRC5D-Hab01 y GPRC5D-Hab02) y un anticuerpo específico anti-CD3 humanizado (CD3-Hab01), y a continuación estos anticuerpos específicos se ensamblaron en un anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3, en donde el método de ensamblaje podría ser en una proporción de 2 : 2 : 2 (BCMA:GPRC5D:CD3) (a modo de ejemplo como se muestra en A-G en la FIG. 1), o 1 : 2 : 1 (BCMA:GPRC5D:CD3 o GPRC5D:BCMA:CD3) (a modo de ejemplo como se muestra en H-J en la FIG. 1) o 1 : 1 : 1 (BCMA:GPRC5D:CD3) (a modo de ejemplo como se muestra en N u O en la FIG. 1) o 2 : 2 : 1 (BCMA:GPRC5D:CD3) (a modo de ejemplo como se muestra en K-M en la FIG. 1), el fragmento de anticuerpo era scFv, Fab o VHH, el subtipo de región constante de cadena pesada era IgG1 o IgG4, y si la molécula era de estructura asimétrica, el emparejamiento incorrecto se redujo mediante "Perilla en orificio". Finalmente, los fragmentos se enlazaron a través de enlazadores y se construyeron en un vector de expresión PTT5 para obtener un plásmido diana. Los diagramas esquemáticos de las moléculas de anticuerpos triespecíficos fueron como se muestran en la FIG. 1, la composición molecular de cada anticuerpo triespecífico fue como se muestra en la Tabla 1, las secuencias de aminoácidos de las moléculas de anticuerpos fueron como se muestran en la Tabla 2 y las CDR de las principales regiones variables de anticuerpos determinados por el sistema de numeración de Kabat fueron como se muestran en la Tabla 3. En este ejemplo, los anticuerpos de control positivo usados fueron un anticuerpo biespecífico REGN5459 (documento WO 2020018820 A1, dirigido al antígeno BCMA y al receptor CD3 expresados en la superficie de los linfocitos T) de Regeneron y un anticuerpo biespecífico JNJ7564 (documento WO 2019220368 A1, dirigido al antígeno GPRC5D y al receptor CD3 expresados en la superficie de los linfocitos T) de Johnson & Johnson, respectivamente, y el anticuerpo de control negativo fue antiFITC×CD3-Hab01 (preparado internamente). Las estructuras de los anticuerpos de control positivo y negativo fueron como se muestran en P-R en la FIG. 1, en que las regiones Fc de REGN5459 y JNJ7564 comprendían mutaciones que impedían la homodimerización.

Tabla 1 Composiciones estructurales de moléculas de anticuerpos triespecíficos

Designación del anticuerpo	Fracción dirigida a BCMA	Fracción dirigida a GPRC5D	Fracción dirigida a CD3	Subtipo de región constante de cadena pesada
Tri-17, Tri-29, Tri-32, Tri-35	BCMA-VHH01	GPRC5D-Hab01	CD3-Hab01	Fc de IgG4
Tri-38, Tri-41				Fc de IgG1 Perilla en orificio
Tri-46, Tri-49, Tri-52, Tri-56, Tri-63, Tri-64	BCMA-VHH02			Fc de IgG4 Perilla en orificio
Tri-55, Tri-59				Fc de IgG4
Tri-60	BCMA-Hab01			Fc de IgG4
Tri-62				Fc de IgG4 Perilla en orificio
Tri-65, Tri-66	BCMA-VHH02	GPRC5D-Hab02		Fc de IgG4 Perilla en orificio

Tabla 2 Secuencias de aminoácidos de las moléculas de anticuerpos

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
BCMA-VHH01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTLDYYMIGWFRQAP GKEREGLSISPADGSTYYADSVKGRFTISRDSKNTVYLMQ NSLRAEDTAVYYCAAGNEATISWGFGPWEYDYWGQGTMTV TVSS	SEQ ID NO.1
BCMA-VHH02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISSIHIMAWYRQAPG KQRELVAGIRNDGSTVYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLMN SLRAEDTAVYYCNADQGFGSYSEWERRSRWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO.2
VH de BCMA-Hab01	EGQMVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYMFTDHTFHWVRQ APGQGLEWMGYIYPRDQNTKYNEKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARAGYYGSSHAMDYWGQGTMTV VSS	SEQ ID NO.3
VL de BCMA-Hab01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPG KSPRLLIYSASSRYTGVPSTRFSGSGTDFFTISSLPEDIAT YYCQQLYSTPWTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO.4

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
VH de GPRC5D-Hab01	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAP GQGLEWMGEIYPRSGNTYYNEKFKGRVTLTADKSTSTAYM ELSSLRSEDТАVYYCARGRAYGRNYPMDYWGGTTVTVSS	SEQ ID NO.5
VL de GPRC5D-Hab01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTSIHWYQQKPGQS PRLLIKYASESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYC QQSNSWPYTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO.6
VH de GPRC5D-Hab02	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYIFTNFGITWVRQAP GQRLEWMGENYPRRINTYYNEKFKGRVTITADKSASTAYM ELSSLRSEDТАVYYCSRKDIFGLSYALDYWGQGTТTVTVSS	SEQ ID NO.7
VL de GPRC5D-Hab02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQHKPG KSPKALIYSASYQYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVA TYICQQYKNYPYTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO.8
VH de CD3-Hab01	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQA PGKGLEWVAMSRNKAAGHTIEYSSSVKGRFTISRDNSTNTL YLQMNSLRSEDТАVYYCARDTYESYDGYFDVWGQGTТTVT VSS	SEQ ID NO.9
VL de CD3-Hab01	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSRSRKNYLAWY QQKPGQTPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCKQSYLYLTFGGGTKLEIK	SEQ ID NO.10
Fc de IgG1_Perilla	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO.11
Fc de IgG1_Orificio	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO.12
Fc de IgG4	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	SEQ ID NO.13

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
	GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	
Fc de IgG4_Perilla	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	SEQ ID NO.14
Fc de IgG4_Orificio	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	SEQ ID NO.15
IgG1_CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKCV	SEQ ID NO.16
IgG4_CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKRV	SEQ ID NO.17
Cadena pesada REGN5459-anti-BCMA	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSNFWMTWVRQA PGKGLEWVANMNQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKSSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDREYCISTSCYDDFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	SEQ ID NO.18
Cadena pesada REGN5459-anti-CD3	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYSMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKFYYGMDVWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT	SEQ ID NO.19

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
	VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHFTQKSLSLSLGK	
REGN5459-cadena ligera común	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYTCQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.20
Cadena pesada JNJ7564-anti-GPRC5D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHFTQKSLSLSLGK	SEQ ID NO.21
Cadena ligera JNJ7564-anti-GPRC5D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSQVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO.22
Cadena pesada JNJ7564-anti-CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	SEQ ID NO.23

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
	YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLL YSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG K	
Cadena ligera JNJ7564-anti- CD3	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS	SEQ ID NO.24
cadena pesada antiFITC×CD 3-Hab01	EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQ SPEKGLEWVAQIRNKPYNITYSYSDSVKGRFTISRDDSKSSV YLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVAMSR NKAAGHTIEYSSSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDTYESYDGYFDVWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSRSRK NYLAWYQQKPGQTPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCKQSYLYTFGQGTKLEIKESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK	SEQ ID NO.25
cadena ligera antiFITC×CD 3-Hab01	DVVMQTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWY LQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV AEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE	SEQ ID NO.26

Designación de secuencia	Secuencia de aminoácidos	Número de secuencia
	SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	

Tabla 3 Secuencias de CDR de anticuerpos determinadas mediante el sistema de numeración de Kabat

Designación de secuencia	CDR1	CDR2	CDR3
BCMA-VHH01	YYMIG SEQ ID NO.27	SISPADGSTYYADSVKG SEQ ID NO.28	GNEATISWGFGPWEYDY SEQ ID NO.29
BCMA-VHH02	IHIMA SEQ ID NO.30	GIRNDGSTVYVDSVKG SEQ ID NO.31	DQGFGSYSEWERRSR SEQ ID NO.32
VH de BCMA-Hab01	DHTFH SEQ ID NO.33	YIYPRDQNTKYNEKFKG SEQ ID NO.34	AGYYGSSHAMDY SEQ ID NO.35
VL de BCMA-Hab01	KASQDVSTAVA SEQ ID NO.36	SASSRYT SEQ ID NO.37	QQLYSTPWT SEQ ID NO.38
GPRC5D-Hab01VH	SYGIS SEQ ID NO.39	EIYPRSGNTYYNEKFKG SEQ ID NO.40	GRAYGRNYPMDY SEQ ID NO.41
GPRC5D-Hab01VL	RASQSIGTSIH SEQ ID NO.42	YASESIS SEQ ID NO.43	QQSNSWPYT SEQ ID NO.44
VH de GPRC5D-Hab02	NFGIT SEQ ID NO.45	ENYPRRINTYYNEKFKG SEQ ID NO.46	KDIFGLSYALDY SEQ ID NO.47
VL de GPRC5D-Hab02	KASQNVGTNVA SEQ ID NO.48	SASYQYS SEQ ID NO.49	QQYKNYPYT SEQ ID NO.50
CD3-Hab01VH	DYYMS SEQ ID NO.51	MSRNLAKGHTIEYSSSVKG SEQ ID NO.52	DTYESYDGYFDV SEQ ID NO.53
CD3-Hab01VL	KSSQSLFNSRSRKNY LA SEQ ID NO.54	WASIRES SEQ ID NO.55	KQSYLYT SEQ ID NO.56

5 Ejemplo 2 Expresión y purificación de la molécula de anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 y anticuerpo de control

2.1 Expresión y purificación de la molécula de anticuerpo triespecífico

[0151] Un plásmido y un reactivo de transfección PEI (Polysciences, número de catálogo: 24765-1) se añadieron a OPTI-MEM (Gibco, número de catálogo: 11058021),

10 se mezclaron uniformemente y a continuación se dejaron reposar durante 15 min. Células

Expi293F (Thermofisher, número de catálogo: A14527) se añadieron y se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5% en un agitador a 120 rpm. En el segundo día de transfección, se añadieron OPM-293 ProFeed (Shanghái OPM Biosciences Co., Ltd., número de catálogo: F081918-001) y 6 g/l de glucosa (Sigma, número de catálogo: G7528). En el sexto día de transfección, se recogió el sobrenadante celular. Después de recoger el sobrenadante del cultivo, la purificación por afinidad de Proteína A y la purificación por tamiz molecular se realizaron en la proteína mediante AKTA Pure. Los anticuerpos obtenidos se analizaron cuantitativa y cualitativamente mediante SDS-PAGE, SEC-HPLC y CE-SDS. De acuerdo con las diferentes estructuras de los anticuerpos, la purificación puede realizarse mediante los siguientes métodos respectivamente:

(A) Método para purificar anticuerpos trispecíficos simétricos

[0152] El método fue adecuado para la purificación de anticuerpos trispecíficos Tri-17, Tri-29, Tri-32, Tri-35, Tri-55, Tri-59 y Tri-60. El método de purificación específico fue como sigue:

1. La purificación primaria se realizó con una columna de proteína A (Mabselect SuReTM, adquirida de Cytiva). La columna de proteína A se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación el sobrenadante de cultivo clarificado se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 8 ml/min. Después de la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de un eluyente con alto contenido de sal (tampón fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). La proteína unida a la columna de proteína A se eluyó con un eluyente (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,5) y la elución de la proteína se controló de acuerdo con el máximo de absorción ultravioleta A₂₈₀. La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0.

2. Se usó un tamiz molecular (Ezload 16/60 Chromdex 200 pg comprado a Bestchrom o Superdex 200 Increase 10/300 GL comprado de Cytiva) para la purificación fina y se recolectó la muestra diana. Después de la concentración, la solución se cambió a tampón 559 (ácido acético 10 mM, sacarosa al 9 %, pH 5,5) por diálisis. Se realizó una filtración aséptica con un filtro de 0,22 µm y la muestra se conservó asépticamente para obtener el anticuerpo correspondiente purificado.

(B) Método para purificar el anticuerpo trispecífico asimétrico de clase I

[0153] El método fue adecuado para la purificación de anticuerpos triespecíficos Tri-38, Tri-41, Tri-46, Tri-49, Tri-52, Tri-56 y Tri-62. El método de purificación específico fue como sigue:

1. La purificación primaria se realizó con una columna de Proteína A. La columna de proteína A se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación el sobrenadante de cultivo clarificado se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 8 ml/min. Después de la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de un eluyente con alto contenido de sal. El semianticuerpo redundante se eliminó con eluyente A (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,85), la proteína diana se eluyó con eluyente B (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,5) y la elución de la proteína se controló de acuerdo con el máximo de absorción ultravioleta A_{280} . La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0.

2. Se usó un tamiz molecular para la purificación fina y se recogió la muestra diana. Después de la concentración, la solución se cambió a tampón 559 mediante diálisis. Se realizó una filtración aséptica con un filtro de 0,22 μ m y la muestra se conservó asépticamente para obtener el anticuerpo correspondiente purificado.

(C) Método para purificar anticuerpos triespecíficos asimétricos de clase II

[0154] El método fue adecuado para la purificación de anticuerpos triespecíficos Tri-63, Tri-64, Tri-65 y Tri-66. El método de purificación específico fue como sigue:

1. La purificación primaria se realizó con una columna de Proteína A. La columna de proteína A se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación el sobrenadante de cultivo clarificado se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 8 ml/min. Después de la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de un eluyente con alto contenido de sal. La proteína unida a la columna de proteína A se eluyó con un eluyente (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,5) y la elución de la proteína se controló de acuerdo con el máximo de absorción ultravioleta A_{280} . La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0.

2. La purificación fina se realizó con HiTrap KappaSelect (comprado de Cytiva). La columna se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación la proteína purificada principalmente se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Después de

la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de PBS, seguido de 10 veces el volumen de la columna de un tampón fosfato 10 mM (pH 7,4). La proteína unida a la columna KappaSelect se eluyó con eluyente C (glicina 50 mM, pH 3,6), la proteína impureza se eluyó con eluyente D (glicina 50 mM, pH 3,0) y la elución de la proteína se controló de acuerdo con el máximo de absorción ultravioleta A280. La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0.

3. Se usó un tamiz molecular para la purificación fina y se recogió la muestra diana. Después de la concentración, la solución se cambió a tampón 559 mediante diálisis. Se realizó una filtración aséptica con un filtro de 0,22 µm y la muestra se conservó asépticamente para obtener el anticuerpo correspondiente purificado.

[0155] Para los anticuerpos triespecíficos purificados por diferentes métodos, las muestras de proteínas a detectar se analizaron mediante SEC-HPLC para caracterizar la homogeneidad del tamaño molecular y la pureza de las proteínas. El HPLC usado fue Agilent 1260, la columna cromatográfica TSKgel G3000SWXL era de Tosoh Bioscience, la fase móvil fue tampón fosfato 200 mM (pH 7,0)/isopropanol (v/v 9 : 1), la temperatura de detección fue de 25 °C, el caudal fue de 0,5 ml/min y la longitud de onda de detección fue de 280 nm. Para los datos SEC-HPLC, el cromatograma se analizó mediante un método de integración manual y la pureza de la proteína se calculó mediante un método de normalización de área. El máximo principal se consideró un monómero, el máximo cromatográfico anterior al máximo principal se denominó agregado y el máximo cromatográfico posterior al máximo principal se denominó fragmento. Los resultados fueron como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de cantidad de expresión de moléculas de anticuerpos triespecíficos y pureza SEC

Designación del anticuerpo	Sistema de expresión	Cantidad de expresión por unidad de volumen (mg/l)	Pureza del monómero SEC (%)
Tri-17	Expi293F	14,54	92,48
Tri-29	Expi293F	42,66	97,61
Tri-32	Expi293F	69,80	91,81
Tri-35	Expi293F	47,36	94,43
Tri-38	Expi293F	38,44	97,77

Designación del anticuerpo	Sistema de expresión	Cantidad de expresión por unidad de volumen (mg/l)	Pureza del monómero SEC (%)
Tri-41	Expi293F	43,74	97,76
Tri-46	Expi293F	28,54	97,73
Tri-49	Expi293F	7,16	96,72
Tri-52	Expi293F	25,15	94,68
Tri-55	Expi293F	31,78	91,55
Tri-56	Expi293F	8,14	95,35
Tri-59	Expi293F	8,37	97,00
Tri-60	Expi293F	13,86	97,88
Tri-62	Expi293F	10,23	96,87
Tri-63	Expi293F	6,21	98,45
Tri-64	Expi293F	7,59	97,41
Tri-65	Expi293F	4,99	97,31
Tri-66	Expi293F	8,47	97,49

2.2 Expresión y purificación del anticuerpo de control

[0156] Anti-hel-hIgG1 (comúnmente abreviado como hIgG1 en la presente solicitud) era un anticuerpo dirigido a la lisozima de huevo de gallina (comprado de Biointron, número de catálogo: B117901), que es un anticuerpo de control negativo común usado en el proceso de detección e identificación de un anticuerpo. El método para expresar REGN5459, JNJ7564 y antiFITC×CD3-Hab01 fue el mismo que la expresión de la molécula de anticuerpo trispecífico en el ejemplo 2.1. Los métodos de purificación fueron como sigue:

(A) Método para purificar REGN5459 y antiFITC×CD3-Hab01

1. La purificación primaria se realizó con una columna de Proteína A. La columna de proteína A se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación el sobrenadante de cultivo clarificado se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 8 ml/min. Después de la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de un eluyente con alto contenido de sal (tampón fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). La proteína diana se eluyó con eluyente A (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,85) y eluyente B (tampón

ácido cítrico 20 mM, pH 3,5) en un gradiente lineal, y la elución de la proteína se monitorizó mediante el pico de absorción ultravioleta A280. La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0.

2. Se usó un tamiz molecular para la purificación fina y se recogió la muestra diana, que finalmente se almacenó en un tampón PBS. Se realizó una filtración aséptica con un filtro de 0,22 µm y la muestra se conservó asépticamente para obtener los anticuerpos purificados REGN5459 y antiFITC×CD3-Hab01.

(B) Método para purificar JNJ7564

1. Los anticuerpos monoespecíficos correspondientes JNJ7564-anti-GPRC5D y JNJ7564-anti-CD3 se purificaron respectivamente mediante una columna de proteína A. La columna de proteína A se equilibró primero con 3 a 5 veces el volumen de la columna de un tampón de equilibrio (un tampón PBS, pH 7,4) y a continuación el sobrenadante de cultivo clarificado se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 8 ml/min. Después de la carga, la columna se eluyó con 3-5 veces el volumen de la columna de un eluyente con alto contenido de sal (tampón fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). La proteína unida a la columna de proteína A se eluyó con un eluyente (tampón ácido cítrico 20 mM, pH 3,5) y la elución de la proteína se controló de acuerdo con el máximo de absorción ultravioleta A280. La proteína eluida se recogió y se neutralizó a pH 5-6 añadiendo Tris-HCl 1 M pH 8,0. El tampón se cambió a un tampón PBS mediante diálisis.

2. Se produjo un anticuerpo biespecífico por reducción y reoxidación *in vitro*. 1-20 mg/ml de anticuerpo anti-GPRC5D/anti-CD3 se mezclaron en una proporción molar de 1,08 : 1, se añadió 2-mercaptoetanol (2-MEA) con una concentración final de 75 mM y la mezcla se incubó a 25-37 °C durante 2-6 h. El tampón se cambió por diálisis o ultrafiltración o desalinización para eliminar el 2-mercaptoetanol (2-MEA). El anticuerpo biespecífico se produjo por oxidación y reensamblaje a 20 °C.

[0157] Para los anticuerpos triespecíficos purificados por diferentes métodos, las muestras de proteínas a detectar se analizaron mediante SEC-HPLC para caracterizar la homogeneidad del tamaño molecular y la pureza de las proteínas. El método fue el mismo que el anterior. Los resultados fueron como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de pureza SEC y cantidad de expresión de moléculas de control

Designación del anticuerpo	Sistema de expresión	Cantidad de expresión por unidad de volumen (mg/l)	Pureza del monómero SEC (%)
REGN5459	Expi293F	54,11	98,64
JNJ7564	Expi293F	14,97	97,19
antiFITC×CD3-Hab01	Expi293F	49,14	94,65

Ejemplo 3 Construcción e identificación de una línea celular de ingeniería genética

3.1 Preparación de células GPRC5D humanas CHOK1 y células GPRC5D de mono CHOK1

[0158] Las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos GPRC5D humana (ID de Gen de NCBI: 55507) y la secuencia de aminoácidos GPRC5D de mono (ID de Gen de NCBI: 102122120) se clonaron en un vector lentivírico pLVX respectivamente, y las partículas víricas se prepararon en células HEK293T. La línea celular CHOK1 se infectó con lentivirus y a continuación se cultivó selectivamente en medio Advanced DMEM/F12 (comprado a Gibco, número de catálogo: 12634028) que contiene 10 µg/ml de puromicina (comprada a Gibco, número de catálogo A1113803) y 10 % (p/p) de suero bovino fetal (comprado a ExCell Bio, número de catálogo: FND500) durante 1 semana. Se usó JNJ7564 como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) (Jackson, número de catálogo: (109605088) se usó como un anticuerpo secundario. La detección se realizó mediante un citómetro de flujo FACS CantoII (adquirido de BD Biosciences). Se amplificaron las células que tenían una alta cantidad de expresión y una forma de pico único, y las células amplificadas se volvieron a detectar mediante un método de citometría de flujo. El grupo de células positivas con mejor crecimiento, una mayor intensidad de fluorescencia y una mejor homogeneidad se seleccionó para un mayor cultivo a mayor escala y a continuación se criopreservaron en nitrógeno líquido.

[0159] Las secuencias JNJ7564-anti-GPRC5D-hIgG1 (GPRC5D-VH y VL) preparadas anteriormente de JNJ7564 se clonaron en los vectores de expresión PTT5-huIgG1 y PTT5-huIgGLC(κ) que comprenden un péptido señal MGWSWILLFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO.57) y una región constante de cadena pesada/ligera humana, respectivamente, para construir un anticuerpo monoclonal

quimérico, que fue encargado a General Biosystems (Anhui) Co., Ltd.) se usó para la identificación y el anticuerpo tuvo una reactividad cruzada con GPRC5D humano y de mono. Los resultados de FACS se mostraron en las FIG. 2A-2B, mostrando un solo máximo, que puede usarse para monitorizar la actividad de unión de las moléculas de unión multiespecíficas al GPRC5D humano y de mono.

3.2 Preparación de la línea celular Flp-inCHO-células BCMA humanas que sobreexpresan el antígeno diana BCMA

[0160] Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del BCMA humano (ID de Gen de NCBI: 608) se clonó en un vector PcDNA5/FRT (comprado de Clontech). La línea celular CHO Flp-in se transfectó y a continuación se cultivó selectivamente en medio F12K (comprado de Gibco, número de catálogo: 21127030) que contiene 600 µg/ml de higromicina (comprada a ThermoFisher, número de catálogo 10687010) y 10 % (p/p) de suero bovino fetal (comprado a ExCell Bio, número de catálogo: FND500) durante 2 semanas. Se usó el anticuerpo REGN5459 como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) (Jackson, número de catálogo: (109605088) se usó como un anticuerpo secundario. La detección se realizó mediante un citómetro de flujo FACS CantoII (adquirido de BD Biosciences). Se amplificaron las células que tenían una alta cantidad de expresión y una forma de pico único, y las células amplificadas se volvieron a detectar mediante un método de citometría de flujo. El grupo de células positivas con mejor crecimiento, una mayor intensidad de fluorescencia y una mejor homogeneidad se seleccionó para un mayor cultivo a mayor escala y a continuación se criopreservaron en nitrógeno líquido.

[0161] Las secuencias REGN5459-anti-BCMA-hIgG1 (BCMA-VH y VL) previamente preparadas de REGN5459 se clonaron en los vectores de expresión PTT5-huIgG1 y PTT5-huIgG1C(κ) que comprenden un péptido señal MGWSWILLFLLSVTAGVHS y una región constante de cadena pesada/ligera humana, respectivamente, para construir un anticuerpo monoclonal quimérico, que fue encargado a General Biosystems (Anhui) Co., Se usó un anticuerpo monoclonal anti-GPRC5D (Ph.D. Ltd.) para la identificación y el anticuerpo tuvo una reactividad cruzada con BCMA humano y de mono. Los resultados de FACS se muestran en la FIG. 3, mostrando un solo máximo, que puede usarse para monitorizar la actividad de unión de las moléculas de unión multiespecíficas al BCMA humano.

3.3 Preparación de la línea celular de transformación estable del gen indicador de la luciferasa

[0162] Un sistema de vector pLv_x-luciferasa-P2A-GFP-RES-hygro se sometió a empaquetamiento de lentivirus y a continuación las células Molp-8 se infectaron víricamente. Después de 24 h, el tampón se cambió y se añadió hygro 0,125 mg/ml para la detección de presión; y después de una prueba de presión con hygro durante 2 semanas, la curtosis de la expresión de GFP detectada por FACS fue aproximadamente 40 veces mayor y el grupo de células se infectó exitosamente. Las células se sembraron usando un método de dilución limitada a 1 célula/pocillo en un total de 3 placas de células de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 2-3 semanas, y crecieron un total de aproximadamente 30 líneas de células monoclonales; y estas células monoclonales se transfirieron a las células de placas de 24 pocillos y a continuación se cultivaron durante 3-4 días, y de acuerdo con el estado de crecimiento celular y la intensidad de GFP, se seleccionaron 3 líneas celulares monoclonales para el cultivo a gran escala, además se detectó la expresión de luciferasa en las células y, finalmente, se obtuvieron células monoclonales Molp-8-Luc con fuerte fluorescencia. El grupo H929-Luc y el grupo RPMI8226-Luc se adquirieron de Nanjing Cobioer Biosciences Co., Ltd. y las células monoclonales se prepararon mediante el mismo método que para Molp-8-Luc.

Ejemplo 4 Identificación de la unión de la molécula de anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 al antígeno diana y CD3

(A) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la proteína BCMA humana y unión cruzada del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la proteína BCMA de mono mediante ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA)

[0163] El método específico fue como sigue: Proteína BCMA humana (comprada a Acro, número de catálogo: BCA-H522y) y proteína BCMA de mono (comprada a Acro, número de catálogo: BCA-C52H7) se diluyeron con PBS hasta una concentración final de 1 µg/ml, respectivamente, y a continuación se añadieron a una placa ELISA de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. La placa se selló con una película de plástico y se incubó durante la noche a 4 °C, la placa se lavó dos veces con PBS al día siguiente y a continuación se agregó una solución de bloqueo [PB+BSA al 2 % (p/p)] para bloquear a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de bloqueo se descartó, la placa se lavó 3 veces con PBS y se diluyó en gradiente de anticuerpo anti-BCMA-GPRC5D-CD3

100 nM o se añadió anticuerpo de control a 50 µl/pocillo. Después de la incubación a 37 °C durante 2 h, la placa se lavó 3 veces con PBS. El anticuerpo secundario antihumano de cabra marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (comprado a Merck, número de catálogo: AP113P) se añadió y se incubó a 37 °C durante 1 h, y la
5 placa se lavó 5 veces con PBS. Se añadió sustrato TMB a 50 µl/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, a continuación se añadió una solución de parada (HCl 1,0 M) a 50 µl/pocillo. Los valores de OD450 nm se leyeron mediante un lector de microplacas ELISA (lector de placas multimodo, EnSight, adquirido de Perkin Elmer). Los resultados fueron como se muestra en las FIG. 4A y 4B, indicando que todas las
10 moléculas de anticuerpos triespecíficos pueden unirse al BCMA humano y tienen una actividad de unión cruzada contra el BCMA de mono. El control del subtipo de IgG fue IgG1 humana (anti-HEL-IgG1).

(B) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a las células GPRC5D humanas CHOK1 y de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a las células GPRC5D de mono CHOK1 mediante ELISA basado en células

[0164] El método específico fue como sigue: Las células requeridas se cultivaron a gran escala en un matraz de cultivo celular T-75 hasta la fase de crecimiento logarítmico, el medio se aspiró, las células se lavaron dos veces con un tampón PBS y a continuación se digirieron con tripsina. A continuación se finalizó la digestión con un medio completo y se pipetearon las células para obtener una suspensión de una sola célula. Después de contar las células y centrifugarlas, el precipitado celular se resuspendió a 4×10^5 células por mililitro con un medio completo, y la suspensión se añadió a una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos a 100 µl/pocillo, y se cultivó durante la noche en
20 una incubadora al 5 % de dióxido de carbono a 37 °C. El día siguiente, se descartó el medio en la placa de 96 pocillos, las células se lavaron una vez con PBS y a continuación se fijaron a temperatura ambiente durante 0,5 h con un fijador de inmunotinción (comprado en Beyotime, número de catálogo: P0098-500ml) a 50 µl/pocillo. Se añadió una solución de bloqueo [PBS+leche desnatada al 5 % (p/v)] para bloquear a temperatura
25 ambiente durante 2 h. La solución de bloqueo se descartó, la placa se lavó 3 veces con PBS y se diluyó en gradiente de anticuerpo anti-BCMA-GPRC5D-CD3 100 nM o se añadió anticuerpo de control a 50 µl/pocillo. Después de la incubación a 37 °C durante 2 h, la placa se lavó 3 veces con PBS. Se añadió anticuerpo secundario de cabra
30

antihumano marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) y se incubó a 37 °C durante 1 h, y la placa se lavó 5 veces con PBS. Se añadió sustrato TMB a 50 µl/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, a continuación se añadió una solución de parada (HCl 1,0 M) a 50 µl/pocillo. Los valores de DO450nm se leyeron mediante un lector de microplacas ELISA. Los resultados fueron como se muestra en las FIG. 5A y 5B, lo que indica que todas las moléculas de anticuerpos triespecíficos pueden unirse a las células GPRC5D humanas CHOK1 y tienen una actividad de unión cruzada contra las células GPRC5D de mono CHOK1.

(C) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la proteína CD3e/d humana y de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la proteína CD3e humana mediante ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA)

[0165] El método específico fue el mismo que el del ejemplo 4 (A), en donde las proteínas para recubrir una placa ELISA de 96 pocillos fueron la proteína CD3e/d humana (comprada de Sino Biological, número de catálogo: CT032-H2508) y proteína CD3e humana (comprada de Sino Biological, número de catálogo: 10977-H08H), respectivamente. Los resultados fueron como se muestra en las FIG. 6A y 6B, lo que indica que las moléculas de anticuerpos triespecíficos se unen a la proteína CD3e/d humana y a la proteína CD3e humana hasta cierto punto.

(D) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la línea celular que sobreexpresa el antígeno diana BCMA y de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a la línea celular que sobreexpresa el antígeno diana GPRC5D mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)

[0166] Las células BCMA humanas Flp-inCHO y las células GPRC5D humanas CHOK1 se cultivaron a gran escala en un matraz de cultivo celular T-75 hasta la fase de crecimiento logarítmico, respectivamente, y las células se pipetearon para obtener una suspensión de células única. Después de contar las células y centrifugarlas, el precipitado celular se resuspendió a 2×10^6 células por mililitro con un tampón FACS (PBS+suero bovino fetal al 2 %). La suspensión se añadió a una placa de reacción FACS de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. 8 concentraciones de anticuerpos anti-BCMA-GPRC5D-CD3 o anticuerpos de control se añadieron a 50 µl/pocillo, en donde la dilución en gradiente se realizó a una relación de dilución de 5 a partir de una concentración de

100 nM. Las células se incubaron a 4 °C durante 1 h. La mezcla obtenida se centrifugó y se lavó 3 veces con un tampón PBS. El anticuerpo secundario anti-hIgG(Fc) Alexa 647 (comprado de Jackson, número de catálogo: 109-605-098) se añadió a 50 µl/pocillo y se incubó en hielo durante 1 h. La mezcla obtenida se centrifugó y se lavó 3 veces con un
5 tampón PBS. Se tomaron 100 µl de la mezcla para la detección y análisis de resultados mediante FACS (FACS Canto™, adquirido de BD Company). El análisis de datos se realizó mediante el software (FlowJo) para obtener la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células. A continuación, se usó un software (GraphPad Prism8) para el análisis, el ajuste de datos y el cálculo de CE50. Los resultados fueron como se muestra
10 en la Tabla 6, la FIG. 7, la Tabla 7 y la FIG. 8, indicando que todas las moléculas de anticuerpos triespecíficos se unen bien a los antígenos diana BCMA y GPRC5D sobreexpresados en las células, respectivamente.

Tabla 6: Detección de la actividad de unión del anticuerpo triespecífico contra células Flp-inCHO-BCMA humanas mediante FACS

Designación del anticuerpo	Flp-inCHO-BCMA humanas	Designación del anticuerpo	Flp-inCHO-BCMA humanas
	CE50 (nM)		CE50 (nM)
Tri-17	2,97	Tri-56	1,30
Tri-59	1,21	Tri-62	14,53
Tri-60	6,84	REGN5459	13,87
Tri-63	2,10	JNJ7564	Negativo
Tri-64	1,08	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo
Tri-65	2,54	Tri-29	2,27
Tri-66	1,09	Tri-35	2,53
REGN5459	9,37	Tri-38	4,43
JNJ7564	Negativo	Tri-41	1,52
antiFITC×CD3-Hab01	Negativo	REGN5459	13,28
Tri-32	2,03	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo
Tri-55	0,92	Tri-49	1,34
Tri-52	1,88	REGN5459	10,40
Tri-46	5,19	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo

Designación del anticuerpo	Flp-inCHO-BCMA humanas	Designación del anticuerpo	Flp-inCHO-BCMA humanas
	CE50 (nM)		CE50 (nM)
REGN5459	11,33	/	
JNJ7564	Negativo		
antiFITC×CD3-Hab01	Negativo		

Tabla 7: Detección de la actividad de unión del anticuerpo triespecífico contra las células CHOK1-GPRC5D humanas mediante FACS

Designación del anticuerpo	CHOK1-GPRC5D humanas	Designación del anticuerpo	CHOK1-GPRC5D humanas
	CE50 (nM)		CE50 (nM)
Tri-17	0,69	Tri-56	0,38
Tri-59	0,59	Tri-62	0,40
Tri-60	0,92	JNJ7564	1,28
Tri-63	3,80	REGN5459	Negativo
Tri-64	3,63	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo
Tri-65	1,66	Tri-29	1,39
Tri-66	1,53	Tri-35	1,78
JNJ7564	2,32	Tri-38	2,06
REGN5459	Negativo	Tri-41	4,30
antiFITC×CD3-Hab01	Negativo	JNJ7564	2,27
Tri-32	3,06	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo
Tri-55	6,26	Tri-49	2,75
Tri-52	2,97	JNJ7564	2,00
Tri-46	2,36	antiFITC×CD3-Hab01	Negativo
JNJ7564	1,73	/	
REGN5459	Negativo		
antiFITC×CD3-Hab01	Negativo		

5 **(E) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a los antígenos diana BCMA y GPRC5D de las células tumorales endógenas mediante FACS**

[0167] El método específico fue el mismo que el del ejemplo 4 (D). En este experimento, se seleccionó una línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 (comprada de ATCC) como célula endógena para detectar la capacidad de unión de las moléculas de anticuerpos triespecíficos, y NCI-H929 era una línea celular con una alta expresión de GPRC5D y BCMA. Los resultados fueron como se muestran en la Tabla 8 y la FIG. 9, lo que indica que las moléculas de anticuerpos triespecíficos pueden unirse fuertemente a una célula tumoral endógena NCI-H929 que expresa los antígenos BCMA y GPRC5D.

Tabla 8: Detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células H929 mediante FACS

Designación del anticuerpo	H929		Designación del anticuerpo	H929	
	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)		Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)
Tri-32	13535	3,53	Tri-56	13799	2,20
Tri-55	18187	1,23	Tri-62	9728	3,13
Tri-52	29813	3,65	REGN5459	13772	55,09
Tri-46	22659	10,27	JNJ7564	1485	34,74
Tri-65	23977	6,32	antiFITC×CD3-Hab01	118	Negativo
REGN5459	19901	61,73	Tri-29	6347	2,67
JNJ7564	1052	30,24	Tri-35	7546	1,55
antiFITC×CD3-Hab01	95	Negativo	Tri-38	9714	5,68
Tri-17	6399	2,53	Tri-41	7802	2,38
Tri-59	9069	1,82	REGN5459	7875	50,50
Tri-60	7034	3,15	JNJ7564	807	36,35
Tri-63	11266	2,70	antiFITC×CD3-Hab01	166	Negativo
Tri-64	7893	1,32	Tri-49	22245	1,82
Tri-66	10410	2,83	REGN5459	21083	23,97
JNJ7564	1591	20,62	JNJ7564	1706	32,71
REGN5459	9578	44,74	antiFITC×CD3-Hab01	210	Negativo
antiFITC×CD3-Hab01	294	Negativo	/		

(F) Detección de la unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a células tumorales endógenas que expresan CD3 y unión del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 a células PBMC humanas y PBMC de mono activadas que expresan CD3 mediante FACS

5 **[0168]** La célula endógena que expresaba CD3 era Jurkat (comprada a ATCC). El proceso de preparación de células PBMC humanas y PBMC de mono que expresan CD3 fue como sigue: Las PBMC aisladas de sangre humana se activaron y cultivaron durante 3 días de acuerdo con los métodos de un kit de activación de linfocitos T humanos (comprado a Miltenyi Biotec, número de catálogo: 130-091-441) y un kit de activación de linfocitos T de mono (comprado de Miltenyi Biotec, número de catálogo: 130-092-919), respectivamente, y a continuación los linfocitos T activadas se cultivaron con un medio 1640 que contenía 100 unidades de proteína IL2 humana (comprada a Acro, número de catálogo: IL2-H4113) y 10 % (v/v) de suero bovino fetal durante 2 semanas. El método de detección por FACS fue el mismo que el del ejemplo 4 (D). Los resultados fueron como se muestra en la Tabla 9, la FIG. 10, la Tabla 10, la FIG. 11A y la FIG. 11B, indicando que las moléculas de anticuerpos triespecíficos se unen a las células Jurkat, las células PBMC humanas y las células PBMC de mono hasta cierto punto.

Tabla 9. Detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células Jurkat mediante FACS

Designación del anticuerpo	Jurkat		Designación del anticuerpo	Jurkat	
	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)		Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)
Tri-17	1152	El ajuste es deficiente	Tri-56	356	El ajuste es deficiente
Tri-59	1804	El ajuste es deficiente	Tri-62	462	El ajuste es deficiente
Tri-60	2233	El ajuste es deficiente	REGN5459	2333	74,74
Tri-63	989	El ajuste es deficiente	JNJ7564	10578	2,90

Designación del anticuerpo	Jurkat		Designación del anticuerpo	Jurkat	
	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)		Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)
Tri-64	478	El ajuste es deficiente	antiFITC×CD3-Hab01	4667	12,01
Tri-65	911	El ajuste es deficiente	Tri-29	418	El ajuste es deficiente
Tri-66	550	El ajuste es deficiente	Tri-35	320	El ajuste es deficiente
JNJ7564	12481	2,04	Tri-38	204	El ajuste es deficiente
REGN5459	2692	El ajuste es deficiente	Tri-41	85	Negativo
antiFITC×CD3-Hab01	4612	19,14	JNJ7564	6738	3,27
Tri-32	3123	369,7	REGN5459	912	49,69
Tri-55	4690	178,7	CD3-Hab01	2724	23,79
Tri-52	1054	El ajuste es deficiente	Tri-49	795	157,4
Tri-46	1528	El ajuste es deficiente	JNJ7564	14803	3,51
REGN5459	5867	66,79	REGN5459	2918	101,1
JNJ7564	23795	1,82	antiFITC×CD3-Hab01	7073	1,79
antiFITC×CD3-Hab01	10474	6,77	/		

Tabla 10. Detección de la actividad de unión de anticuerpos triespecíficos contra células PBMC humanas y PBMC de mono mediante FACS

Designación del anticuerpo	PBMC humanas		PBMC de mono	
	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)
Tri-32	1777	El ajuste es deficiente	1682	El ajuste es deficiente
Tri-56	359	El ajuste es deficiente	575	El ajuste es deficiente
Tri-63	1340	El ajuste es deficiente	434	El ajuste es deficiente
Tri-64	954	El ajuste es deficiente	348	El ajuste es deficiente
Tri-65	418	El ajuste es deficiente	377	El ajuste es deficiente
Tri-66	313	El ajuste es deficiente	345	El ajuste es deficiente
Tri-46	1223	El ajuste es deficiente	416	El ajuste es deficiente
Tri-55	2264	149,1	2032	158,9
JNJ7564	25390	5,21	21427	5,79
REGN5459	2116	223,2	922	El ajuste es deficiente
antiFITC×CD3-Hab01	4605	El ajuste es deficiente	3450	15,25
Tri-17	2168	El ajuste es deficiente	3279	El ajuste es deficiente

Designación del anticuerpo	PBMC humanas		PBMC de mono	
	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)	Intensidad máxima de fluorescencia media	CE50 (nM)
Tri-29	6729	160,9	5634	El ajuste es deficiente
Tri-35	2236	81,36	1968	El ajuste es deficiente
Tri-38	1100	El ajuste es deficiente	1444	El ajuste es deficiente
Tri-41	235	El ajuste es deficiente	417	El ajuste es deficiente
Tri-49	1730	31,79	1384	59,41
Tri-52	1290	El ajuste es deficiente	693	El ajuste es deficiente
Tri-59	3514	92,06	5279	249,3
Tri-60	2686	El ajuste es deficiente	3572	El ajuste es deficiente
Tri-62	452	El ajuste es deficiente	740	85,49
JNJ7564	26284	7,36	21615	5,72
REGN5459	4366	220,9	1798	161
antiFITC×CD3-Hab01	5966	El ajuste es deficiente	4471	12,45

(G) Detección de la actividad de activación del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 en células Jurkat-NFAT-NanoLuc

[0169] Se prepararon células Jurkat-NFAT-NanoLuc: Las células Jurkat
5 (adquiridas en ATCC) se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (Costar: 3516)

que contenían 2 ml de un medio completo (RPM1640, FBS al 10 % de grado superior, penicilina-estreptomicina) a 1E6 células/pocillo, y se cultivaron continuamente a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 h. El día siguiente, 3 µg de vector pNL[NLucP/NFAT-RE/Hygro] y 3 µl de reactivo PLUS (Invitrogen: 11514-015) se diluyeron en 150 µl de Opti-MEM (Gibco: 11058021) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. El vector pNL[NLucP/NFAT-RE/Hygro] contenía NFAT, que impulsó al gen reportero de la luciferasa NanoLuc a transcribir en respuesta a la activación del TCR. Después de la incubación, la solución de ADN diluida se preincubó con una solución de Lipofectamina LTX 1 : 1 (Invitrogen: 15338-100) (6 µl de Lipofectamina LTX+144 µl de Opti-MEN), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min para formar un complejo ADN-Lipofectamina LTX. Después de la incubación, se añadieron 300 µl del complejo ADN-Lipofectamina directamente a los pocillos que contenían células. Las células Jurkat se transfectaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 h. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y se cultivaron selectivamente durante 2 semanas en 1640 (comprado a Gibco, número de catálogo: 31870082) que contiene higromicina 125 µg/ml (Invitrogen: 10687010) y 10 % (p/p) de suero bovino fetal para obtener la línea celular Jurkat-NFAT-NanoLuc requerida.

[0170] El anticuerpo trispecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 y el anticuerpo de control se diluyeron en gradiente a una relación de dilución de 5 a partir de 100 nM (concentración final) o se diluyeron en gradiente a una relación de dilución de 3 a partir de 100 nM (concentración final), respectivamente, el diluyente es un medio RPMI 1640 que contiene 5 % de suero bovino fetal. El anticuerpo diluido se añadió a una placa de cultivo celular transmisora de luz, de fondo plano y color negro, de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. Las células H929 o las células negativas K562 y las células Jurkat-NFAT-NanoLuc se cultivaron a gran escala en un matraz de cultivo de linfocitos T-75 hasta la fase de crecimiento logarítmico, respectivamente, y las células se pipetearon para obtener una suspensión de células única. Después de contar las células y centrifugarlas, el precipitado celular se resuspendió a 2×10^6 células por mililitro con un medio 1640 que contenía 5 % de suero bovino fetal, y las tres células se añadieron a la placa de cultivo celular de 96 pocillos anterior a 25 µl/pocillo, respectivamente. Después de mezclar uniformemente, las células se incubaron en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % (v/v) durante 5-6 h. Después de la incubación, 50 µl del sistema de detección del gen indicador de luciferasa Nano-Glo (comprado a Promega, número de catálogo: N1110) se añadieron

a cada pocillo y la placa se colocó en un oscilador para una incubación oscilante durante 10 minutos. Finalmente, los valores de fluorescencia se leyeron mediante un lector de placas (lector de placas multimodo, EnSight, adquirido de Perkin Elmer). Los resultados fueron como se muestra en la Tabla 11 y las FIG. 12A y 12B, indicando que las moléculas de anticuerpos triespecíficos pueden activar bien las células Jurkat-NFAT-NanoLuc bajo la mediación de células H929 que expresan los antígenos diana BCMA y GPRC5D, y no activan las células Jurkat-NFAT-NanoLuc o producen una activación no específica extremadamente débil bajo la mediación de células negativas K562 que no expresan BCMA y GPRC5D.

Tabla 11. Detección de la actividad de activación de anticuerpos triespecíficos contra células Jurkat-NFAT-NanoLuc bajo mediación de células H929 y células K562, respectivamente, por FACS

Designación del anticuerpo	Jurkat-NFAT-NanoLuc			
	H929		K562	
	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)
Tri-17	205040	0,0004	74080	El ajuste es deficiente
Tri-32	179680	0,05	44960	El ajuste es deficiente
Tri-46	203800	0,09	53080	El ajuste es deficiente
Tri-55	216920	0,07	36040	El ajuste es deficiente
Tri-56	238080	0,02	96960	El ajuste es deficiente

Designación del anticuerpo	Jurkat-NFAT-NanoLuc			
	H929		K562	
	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)
REGN5459	219840	0,75	17280	El ajuste es deficiente
JNJ7564	194640	0,04	32920	El ajuste es deficiente
antiFITC×CD3-Hab01	29720	Negativo	35680	Negativo
Tri-52	212360	0,08	33040	El ajuste es deficiente
Tri-59	214840	0,004	109800	El ajuste es deficiente
Tri-60	178560	0,0004	84520	El ajuste es deficiente
Tri-62	208280	0,001	99400	El ajuste es deficiente
Tri-63	212240	0,08	7200	El ajuste es deficiente
Tri-64	155920	0,16	12040	El ajuste es deficiente
Tri-65	196200	0,22	7440	El ajuste es deficiente

Designación del anticuerpo	Jurkat-NFAT-NanoLuc			
	H929		K562	
	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)
Tri-66	155560	0,29	10560	El ajuste es deficiente
REGN5459	217520	0,64	22680	El ajuste es deficiente
JNJ7564	188880	0,02	26760	El ajuste es deficiente
antiFITC×CD3-Hab01	12280	Negativo	18200	Negativo
Tri-29	163930	0,05	31520	El ajuste es deficiente
Tri-35	143340	0,14	31330	El ajuste es deficiente
Tri-38	206700	0,06	74840	El ajuste es deficiente
Tri-41	175380	0,16	24880	El ajuste es deficiente
REGN5459	181640	1,22	8040	El ajuste es deficiente
JNJ7564	165410	0,09	37780	El ajuste es deficiente
antiFITC×CD3-Hab01	11360	Negativo	11840	Negativo

Designación del anticuerpo	Jurkat-NFAT-NanoLuc			
	H929		K562	
	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)	Intensidad de fluorescencia máxima	CE50 (nM)
Tri-49	63610	0,74	34950	El ajuste es deficiente
REGN5459	117990	2,08	9030	El ajuste es deficiente
JNJ7564	90660	0,17	31340	El ajuste es deficiente
antiFITC×CD3-Hab01	11470	Negativo	19660	Negativo

Ejemplo 5 Detección de la actividad destructora de linfocitos T contra células tumorales bajo la mediación del anticuerpo triespecífico anti-BCMA-GPRC5D-CD3 *in vitro* y detección de la producción de citocinas

- 5 [0171] En este experimento, se seleccionaron tres líneas celulares de mieloma múltiple humano como células diana para el experimento de eliminación de linfocitos T *in vitro*, entre las cuales NCI-H929 era una línea celular con una alta expresión tanto de GPRC5D como de BCMA, RPMI8226 era una línea celular con una expresión media-baja de GPRC5D y una expresión media de BCMA, y Molp-8 era una línea celular con
- 10 una expresión alta de GPRC5D y una expresión baja de BCMA. Para facilitar la detección experimental posterior, se construyeron las tres líneas celulares de transformación estables mencionadas anteriormente que expresan luciferasa de forma estable, en lo sucesivo en el presente documento denominadas H929-Luc, RPMI8226-Luc y Molp-8-Luc (véase 3.3 del ejemplo 3 para el método de construcción).
- 15 [0172] El primer día del experimento, las PBMC (células mononucleares de sangre periférica humana) de donante sano, que fueron criopreservadas en nitrógeno líquido, se resucitaron, se resuspendieron en un medio RPMI-1640 y se cultivaron en un matraz de cultivo durante la noche en una incubadora de CO₂ al 5 %, 37 °C para su uso posterior.

El segundo día, las células H929-Luc, RPMI8226-Luc y Molp-8-Luc se tomaron para preparar una suspensión de células individuales, respectivamente. Usando un medio completo, la densidad de células tumorales se ajustó a $1,33 \times 10^5$ células/ml y la densidad de PBMC se ajustó a $1,33 \times 10^6$ células/ml. Se tomaron 75 µl de las H929-Luc, RPMI8226-Luc o Molp-8-Luc ajustadas y se mezclaron uniformemente con 75 µl de PBMC (la cantidad de células tumorales y PBMC en cada pocillo fue 1×10^4 células y 1×10^5 células, respectivamente) y el líquido de mezcla de células se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U mediante una micropipeta a 150 µl/pocillo. El anticuerpo se diluyó en gradiente con un medio completo (la concentración inicial del anticuerpo fue 100 nM, una relación de dilución de 7 y 8 gradientes de concentración), respectivamente, y los diluyentes de anticuerpos en diferentes concentraciones se añadieron a cada pocillo a 100 µl/pocillo, el volumen final en cada pocillo fue de 250 µl. Después de mezclar uniformemente, las células se colocaron en una incubadora de CO₂ al 5 %, 37 °C. Después de cultivar durante 48 h, se tomaron 100 µl del sobrenadante para detectar las citocinas IFN γ y TNF α en el sobrenadante del medio celular. Las células restantes continuaron cultivándose en una incubadora de CO₂ al 5 %, 37 °C. Después de continuar el cultivo durante 24 h, la viabilidad celular se detectó con el kit Bright-Glo Luciferasa (comprado a Promega, número de catálogo: E2620, hágase referencia a las instrucciones de uso del producto). El pocillo al que solo se le añadió PBMC se definió como un control positivo con una tasa de destrucción del 100 %, la célula en la cual la concentración de anticuerpos era 0 se definió como control negativo en blanco, la viabilidad celular = (valor de lectura del pocillo de muestra-valor de lectura del pocillo positivo)/(valor de lectura del pocillo en blanco-valor de lectura del pocillo positivo) $\times$ 100 %, y los resultados se calcularon y se graficaron mediante el software GraphPad Prism 9.0.

[0173] Las células diana usadas para la destrucción *in vitro* de algunos anticuerpos triespecíficos eran células Molp-8 que no expresan luciferasa y el método para la incubación mixta de PBMC, células tumorales y anticuerpos eran las mismas que las anteriores. Después del cocultivo durante 24 h, la placa de cultivo celular se centrifugó a una velocidad rotatoria de 300 g y se transfirieron 100 µl del sobrenadante para detectar las citocinas liberadas del sobrenadante del medio celular. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante restante a una placa de 96 pocillos de fondo plano y se detectó el valor de LDH liberado por las células en el sobrenadante del medio restante en cada pocillo

usando un kit de detección de LDH (comprado a DO JINDO, número de catálogo: CK12, hágase referencia las instrucciones de uso del producto) y el porcentaje de eliminación de las células diana se calculó de acuerdo con el método indicado en las instrucciones del producto del kit.

5 **[0174]** Había dos métodos para detectar citocinas. Un método fue: detectar la liberación de citocinas en un medio mediante un citómetro de flujo con el kit de citocinas humanas Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (comprado a BD, número de catálogo: 560484, hágase referencia a las instrucciones de uso del producto del kit); y el otro método fue: detectar citocinas IFN γ y TNF α en un sobrenadante de medio celular
10 mediante un método ELISA (el kit se adquirió a BD, número de catálogo: 555142 y 55521, respectivamente, y hágase referencia a las instrucciones de uso del producto del kit).

[0175] Los resultados de la eliminación de linfocitos T sobre células tumorales bajo la mediación de los anticuerpos triespecíficos fueron los que se muestran en la FIG. 13, la FIG. 15, la FIG. 17 y la Tabla 12, respectivamente, indicando que los anticuerpos triespecíficos pueden producir un efecto destructor mejor o comparable en diferentes células tumorales en comparación con el control positivo, y los efectos destructores de los linfocitos T en Molp-8 bajo la mediación de los anticuerpos triespecíficos Tri-38 y Tri-41, respectivamente, eran más débiles que los del control positivo. Para las citocinas
20 TNF α e IFN γ secretadas durante la destrucción *in vitro* de células tumorales, los resultados fueron como se muestra en las FIG. 14A-14B, las FIG. 16A-16B y las FIG. 18A-18B, indicando que los linfocitos T pueden secretar una cierta cantidad de citocinas al destruir células tumorales bajo la mediación de los anticuerpos triespecíficos Tri-29, Tri-35, Tri-46 y Tri-55.

25 **Tabla 12. Efectos de destrucción de los linfocitos T sobre células H929-Luc, RPMI8226-Luc y Molp-8-Luc o Molp-8, respectivamente, bajo mediación de anticuerpos triespecíficos**

Designación del anticuerpo	H929-Luc		RPMI8226-Luc		Molp-8-Luc	
	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)
JNJ7564	99,0	33,0	49,0	276,0	94,0	32,0
REGN5459	99,0	58,0	84,0	275,0	95,0	419,0

Designación del anticuerpo	H929-Luc		RPMI8226-Luc		Molp-8-Luc	
	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)
Tri-17	100,0	2,3	84,8	34,6	95,7	2,6
Tri-59	101,0	3,4	88,8	17,4	97,2	1,5
Tri-60	99,4	7,8	88,3	112,5	95,4	6,0
JNJ7564	99,0	31,0	54,0	98,0	94,0	14,0
REGN5459	100,0	64,0	89,0	187,0	94,0	280,0
Tri-56	99,4	9,0	84,0	33,9	95,7	5,8
Tri-32	100,9	2,3	92,1	2,0	95,4	0,9
Tri-62	100,2	11,2	82,8	464,5	92,5	6,6
JNJ7564	98,0	23,0	46,0	70,0	98,0	8,4
REGN5459	98,0	73,0	94,0	20,0	100,0	136,0
Tri-52	98,0	5,1	93,0	1,0	97,0	0,1
Tri-55	98,0	3,9	96,0	El ajuste es deficiente	97,0	0,1
JNJ7564	99,5	13,2	55,2	122,4	91,5	34,2
REGN5459	99,6	78,7	90,0	170,7	95,5	383,0
Tri-63	99,8	17,1	93,9	6,8	95,3	1,1
Tri-64	99,8	52,1	93,7	3,6	95,5	1,5
Tri-65	100,0	16,0	93,7	10,7	94,6	1,7
Tri-66	100,3	46,0	92,0	11,6	93,3	3,6
Designación del anticuerpo	H929-Luc		RPMI8226-Luc		Molp-8	
	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)
JNJ7564	100,0	26,0	77,6	260,2	14,0	40,0
REGN5459	100,0	192,0	96,7	190,9	17,0	925,0
antiFITC×CD 3-Hab01	9,5	El ajuste es	24,2	El ajuste es deficiente	0,9	El ajuste es deficiente

Designación del anticuerpo	H929-Luc		RPMI8226-Luc		Molp-8-Luc	
	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)	Tasa de destrucción máxima (%)	CI50 (nM)
		deficiente				
Tri-46	100,0	5,8	97,6	3,3	14,0	4,6
Tri-49	100,0	29,0	98,0	12,4	16,0	11,0
JNJ7564	99,0	32,0	77,0	214,0	24,0	35,0
RGEN5459	100,0	52,0	97,0	92,0	23,0	974,0
Tri-29	99,0	0,3	93,0	0,8	26,0	0,7
Tri-35	99,0	2,1	86,0	9,2	24,0	2,3
Tri-38	100,0	3,4	85,0	44,0	17,0	44,0
Tri-41	101,0	20,0	72,0	El ajuste es deficiente	19,0	6155,0