



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019020219-6 A2



(22) Data do Depósito: 03/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/11/2020

(54) **Título:** ANTICORPO BIESPECÍFICO, ANTICORPO ANTI-CD37, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO BIESPECÍFICO, DO ANTICORPO ANTI-CD37 OU DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA INDUZIR A MORTE CELULAR, OU INIBIR O CRESCIMENTO E/OU A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA TUMORAL QUE EXPRESSA CD37, MÉTODO DE TRATAMENTO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, ANTICORPO ANTI-IDIOTÍPICO, E, MÉTODO IN VITRO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM ANTÍGENO CD37 HUMANO OU UMA CÉLULA QUE EXPRESSA CD37 HUMANO.

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61P 35/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 27/03/2018 EP PCT/EP2018/057836; 31/03/2017 US 62/479,712.

(71) **Depositante(es):** GENMAB HOLDING B.V..

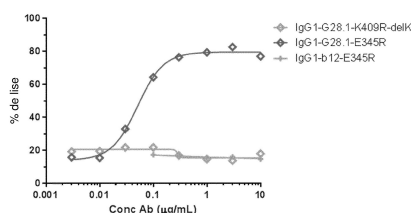
(72) **Inventor(es):** SIMONE OOSTINDIE; FRANK BEURSKENS; ESTHER BREIJ; EDWARD VAN DEN BRINK; ANDREAS HOLLENSTEIN; MARIJE OVERDIJK; MARGARET LINDORFER; RONALD TAYLOR; PAUL PARREN; HILMA VAN DER HORST; MARTINE E.D. CHAMULEAU; TUNA MUTIS.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018058479 de 03/04/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/178396 de 04/10/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 26/09/2019

(57) **Resumo:** Moléculas de anticorpo biespecífico específicas de CD37 que se ligam a diferentes epítomos do antígeno CD37 humano cujas moléculas de anticorpos biespecíficos melhoraram as interações Fc-Fc após a ligação a CD37 na superfície da célula. A invenção também se refere aos anticorpos parentais monoclonais dos quais é obtida a primeira ou a segunda região de ligação das moléculas de anticorpo biespecífico. A invenção também se refere a composições farmacêuticas contendo essas moléculas e ao tratamento de câncer e outras doenças utilizando essas composições.



ANTICORPO BIESPECÍFICO, ANTICORPO ANTI-CD37, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO BIESPECÍFICO, DO ANTICORPO ANTI-CD37 OU DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA INDUZIR A MORTE CELULAR, OU INIBIR O CRESCIMENTO E/OU A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA TUMORAL QUE EXPRESSA CD37, MÉTODO DE TRATAMENTO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, ANTICORPO ANTI-IDIOTÍPICO, E, MÉTODO *IN VITRO* PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM ANTÍGENO CD37 HUMANO OU UMA CÉLULA QUE EXPRESSA CD37 HUMANO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a anticorpos biespecíficos que se ligam especificamente ao antígeno CD37 humano. A invenção se refere, em particular, a moléculas de anticorpo biespecíficos específicas de CD37 que se ligam a diferentes epítomos do antígeno CD37 humano, onde as moléculas de anticorpos biespecíficas têm interações Fc-Fc melhoradas após a ligação a CD37 na superfície da célula e, portanto, têm funções efetoras melhoradas. A invenção também se refere a novos anticorpos parentais monoclonais a partir dos quais é obtida a primeira ou a segunda região de ligação ao antígeno das moléculas de anticorpo biespecífico. A invenção também se refere a composições farmacêuticas contendo essas moléculas e ao tratamento de câncer e outras doenças utilizando essas composições.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O antígeno leucocitário CD37 (“CD37”), também conhecido como GP52-40, tetraspanin-26 ou TSPAN26, é uma proteína transmembranar da superfamília da tetraspanina (Maecker *et al.*, FASEB J. 1997; 11: 428 a 442). Na fisiologia normal, o CD37 é expresso nas células B durante os estágios pré-B das células B maduras periféricas, mas está ausente nas células plasmáticas (Link *et al.*, J. Pathol. 1987; 152: 12 a 21). O antígeno CD37 é

apenas fracamente expresso em células T e células mieloides, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e granulócitos (Schwartz-Albiez *et al.*, J. Immunol 1988; 140 (3): 905 a 914). O CD37 é amplamente expresso em células malignas em uma variedade de leucemias e linfomas de células B, incluindo linfoma não Hodgkin (LNH) e leucemia linfóide crônica (LLC) (Moore *et al.* J. Immunol. 1986; 137 (9): 3013).

[003] Vários agentes direcionadores de CD37 baseados em anticorpos estão sendo avaliados como terapêutica potencial para malignidades de células B e outras malignidades. Estes incluem, por exemplo, radioimuno-conjugados como Betalutin®, conjugados anticorpo-fármaco como IMG529 e AGS-67E e anticorpos reformados ou modificados por engenharia de Fc como otlertuzumab e BI 836826 (Robak e Robak, Expert Opin Biol Ther 2014; 14 (5): 651 a 661). Os anticorpos anti-CD37 foram propostos para uso como agentes terapêuticos nos formatos descritos acima e outros formatos (ver, por exemplo, WO 2012/135740, WO 2012/007576, WO 2011/112978, WO 2009/126944, WO 2011/112978 e EP 2 241 577).

[004] Betalutin é um anticorpo anti-CD37 de camundongo, lilotomab (anteriormente HH1/tetulomab), conjugado com 177-lutécio. Betalutin se internaliza rapidamente, inibe o crescimento de células B *in vitro* e prolonga a sobrevivência em uma injeção i.v. Modelo Daudi-SCID (Dahle *et al* 2013, Anticancer Res 33: 85 a 96).

[005] IMG529 é um ADC que consiste no anticorpo K7153A conjugado com o maitansinóide DM1 por meio de um ligante SMCC. É relatado que o anticorpo K7153 induz apoptose em células Ramos que expressam CD37 na ausência de reticulação. Também induziu CDC e ADCC nas linhagens celulares de linfoma de Burkitt, embora a capacidade de induzir CDC fosse muito menor em comparação ao rituximabe (Deckert *et al*, Blood 2013; 122 (20): 3500 a 3510). Estas funções efectoras de K7153A mediadas por Fc são retidas no anticorpo conjugado com DM-1.

[006] A Agensys está desenvolvendo o AGS-67E, um mAb humano anti-CD37 IgG2 conjugado à monometil auristatina E. O AGS67E induz citotoxicidade e apoptose potentes (Pereira *et al.*, Mol Cancer Ther 2015; 14 (7): 1650 a 1660).

[007] O otlertuzumabe (originalmente conhecido como TRU-016) é um SMIP (imuno-farmacêutico modular pequeno; SMIPS são dímeros ligados a dissulfeto de proteínas de cadeia única constituídos por um VH/VL de ligação ao antígeno, uma região de dobradiça de conexão e um Fc (fragmento, cristalizável) (CH2-CH3)). Seus mecanismos de ação são a indução de apoptose e ADCC, mas não o CDC (Zhao *et al.* 2007, Blood 110 (7), 2569 a 2577).

[008] O mAb37.1/BI 836826 é um anticorpo quimérico que é projetado para ligação de alta afinidade a FcγRIIIa (CD16a) (Heider *et al.* 2011, Blood 118: 4159 a 4168). Possui atividade pró-apoptótica independente da reticulação de IgG Fc, embora a atividade pró-apoptótica seja aumentada por reticulação. Mostra ADCC potente de linhagens celulares CD37+ B e células LLC primárias.

[009] Apesar destes e de outros avanços na técnica, ainda é necessário melhorar os anticorpos anti-CD37 para o tratamento de câncer e outras doenças.

[0010] Por conseguinte, é um objetivo da presente invenção fornecer anticorpos anti-CD37 que podem ser úteis no tratamento de câncer e/ou outras doenças. É um objetivo da presente invenção fornecer anticorpos anti-CD37 que são melhorados em relação ao CDC de células humanas por complemento humano em comparação com os anticorpos da técnica anterior. É um objetivo adicional fornecer um anticorpo biespecífico com braços de ligação obtidos de dois anticorpos parentais que se ligam a diferentes epítomos no CD37 e cujo anticorpo biespecífico aumentou o CDC e/ou ADCC em comparação com uma combinação dos dois anticorpos monoclonais parentais que se ligam

aos referidos diferentes epítomos, e/ou ao anticorpo monoclonal dos parentais por si só. É outro objetivo fornecer novos anticorpos monoclonais que se ligam a diferentes epítomos em CD37, em particular, é um objetivo fornecer anticorpos anti-CD37 que se ligam a novos epítomos de CD37. É outro objetivo da presente invenção fornecer novos anticorpos monoclonais que se ligam a diferentes epítomos em CD37, cujos anticorpos monoclonais podem servir como anticorpos parentais para os anticorpos biespecíficos da invenção. É outro objetivo fornecer anticorpos biespecíficos que se ligam a dois epítomos diferentes em CD37 e cujos anticorpos biespecíficos melhoraram a interação Fc-Fc após a ligação a CD37 na membrana plasmática em comparação com um anticorpo biespecífico do mesmo isotipo e com braços de ligação idênticos aos do anticorpo biespecífico da invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] Os inventores da presente invenção constataram surpreendentemente que um anticorpo biespecífico com especificidade de ligação contra dois epítomos diferentes em CD37 e com uma mutação aumentando a interação Fc-Fc após a ligação a CD37 na membrana plasmática era mais potente na indução de CDC do que uma combinação de dois anticorpos anti-CD37, cada um com uma especificidade de ligação em relação a um dos dois epítomos diferentes em CD37 e com a mesma mutação para melhorar a interação Fc-Fc, ou um anticorpo com a mesma mutação para melhorar a interação Fc-Fc por si só. Além disso, um anticorpo biespecífico com especificidade de ligação contra dois epítomos diferentes em CD37 e com uma mutação que aumenta as interações Fc-Fc foi mais potente na indução de ADCC do que uma combinação de dois anticorpos anti-CD37, cada um com especificidade de ligação em relação a um dos dois epítomos diferentes em CD37 e com a mesma mutação melhorando a interação Fc-Fc.

[0012] Por conseguinte, a invenção se refere a novos anticorpos biespecíficos que se ligam ao CD37 humano que têm propriedades vantajosas

em termos de suas características de ligação ao antígeno, sua capacidade de induzir CDC e ADCC, sua interação Fc-Fc após a ligação a alvos ligados à membrana, seu efeito citotóxico nas células que expressam CD37 e outras propriedades, como aqui descrito.

[0013] Por conseguinte, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno que se liga ao CD37 humano tendo a sequência da SEQ ID NO: 62 e uma primeira e uma segunda regiões Fc de uma imunoglobulina humana, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno se ligam a diferentes epítomos no CD37 e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem uma ou mais mutações de aminoácidos cuja(s) mutação(ões) aprimora(m) a interação Fc-Fc entre os anticorpos biespecíficos após a ligação ao CD37 ligado à membrana em comparação com a interação Fc-Fc entre anticorpos biespecíficos que não possuem a(s) referida(s) mutação(ões).

[0014] Assim, em um aspecto, um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno que se liga ao CD37 humano com a sequência da SEQ ID NO: 62 e uma primeira e uma segunda regiões Fc de uma imunoglobulina humana, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno ligam diferentes epítomos em CD37 e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem uma ou mais mutações de aminoácidos cujas mutações melhoram a interação Fc-Fc entre anticorpos biespecíficos após a ligação ao alvo ligado à membrana em comparação com a interação Fc-Fc entre anticorpos biespecíficos sem a referida mutação.

[0015] Em um segundo aspecto, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 que se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1

estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

[0016] Em um terceiro aspecto, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 que se liga ao CD37 humano cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27 e sequência CDR2: YAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; [016] ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6 e sequência CDR2: EAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7. [004]

[0017] Em um quarto aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo biespecífico ou o anticorpo da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0018] Em um quinto aspecto, a invenção se refere ao anticorpo

biespecífico ou ao anticorpo ou à composição da invenção para uso como medicamento. Em aspectos específicos, eles são para uso no tratamento de câncer ou uma doença autoimune ou distúrbios inflamatórios e, em particular, para uso no tratamento de doenças malignas de células B.

[0019] Em outros aspectos, a invenção se refere a métodos de tratamento, a tratamentos combinados, a sequências de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção, a vetores e células hospedeiras que as expressam e a métodos de detecção de presença ou antígeno CD37 ou células que expressam antígenos CD37 em uma amostra ou em um indivíduo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0020] **Figura 1: CDC mediado por variantes G28.1 em células tumorais primárias de LLC.** A capacidade de induzir CDC em células tumorais primárias de LLC (A) IgG1-G28.1-K409R-delK, IgG1-G28.1-E345R ou IgG1-b12-E345R (células: derivada do paciente, diagnosticado recentemente/não tratado (PB = derivada de sangue periférico)) e (B) IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G ou IgG1-b12 (células: derivada do paciente, diagnosticado recentemente /não tratado (BM = derivada da medula óssea)) foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo.

[0021] **Figura 2: Determinação quantitativa dos níveis de expressão de CD37, CD46, CD55 e CD59 em células tumorais LLC.** Os níveis de expressão de CD37, CD46, CD55 e CD59 nas células LLC de um paciente (Paciente VM-PB0005 diagnosticado recentemente/não tratado) foram determinados por citometria de fluxo. A quantidade de antígeno é mostrada como moléculas/célula. mIgG1 é IgG1 de camundongo, κ Controle de Isotipo.

[0022] **Figura 3: Ligação de anticorpos CD37 humanizados e suas variantes a células Daudi.** Ligação de IgG1-004-H5L2, IgG1-004-H5L2-

E430G, IgG1-005-H1L2, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2. As células IgG1-016-H5L2-E430G para Daudi foram determinadas por citometria de fluxo. Os dados mostrados são valores médios de intensidade de fluorescência (MFI), para um experimento representativo.

[0023] **Figura 4: Ligação de G28.1 e 37.3 e suas variantes às células Daudi.** A ligação de células IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-37.3 e IgG1-37.3-E430G a células Daudi foi determinada por citometria de fluxo. Os dados mostrados são valores médios de intensidade de fluorescência (MFI), para um experimento representativo.

[0024] **Figura 5: Ligação de variantes do anticorpo CD37 humanizado IgG1-016-H5L2 a células Daudi.** A ligação de células IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G e IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G a células Daudi foi determinada por citometria de fluxo. Os dados mostrados são valores médios de intensidade de fluorescência (MFI), para um experimento representativo.

[0025] **Figura 6: Ligação de variantes de anticorpo CD37 a células CHO que expressam CD37 de cinomolgo.** A ligação de IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-G28.1 e IgG1-G28.1-E430G foi determinada por citometria de fluxo. Os dados mostrados são valores médios de intensidade de fluorescência (MFI), para um experimento representativo.

[0026] **Figura 7: Determinação da competição de ligação entre anticorpos CD37 e CDC mediados por anticorpos humanizados CD37, variantes dos mesmos e combinações de anticorpos CD37 em células Raji.** (A) Competição de ligação entre IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G foi determinado por citometria de fluxo. As células Raji foram incubadas com anticorpos não marcados para ligação

primária e subsequentemente com anticorpos de sondagem marcados com Alexa Fluor 488. A perda de ligação dos anticorpos de sondagem marcados com A488 após pré-incubação com um anticorpo não marcado, em comparação com a ligação isolada do anticorpo marcado com A488, indica competição de ligação entre o anticorpo marcado com A488 e o anticorpo não marcado. Os dados mostrados são valores duplicados de Moléculas de Fluorocromo Solúvel Equivalente (MESF), para um experimento representativo. (BG) A capacidade de induzir CDC nas células Raji de IgG1-004-H5L2, de IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2, IgG1-016-H5L2 e IgG1-37.3, com ou sem mutação E430G, e combinações dos mesmos foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo.

[0027] **Figura 8: Visão geral esquemática da competição de ligação entre anticorpos CD37.** Competição de ligação entre IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E4340G para Raji. As células foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos não marcados para ligação primária e anticorpos de sondagem marcados com Alexa Fluor 488 para detecção de ligação subsequente de um anticorpo concorrente. Indicação de cor: preto; ligação simultânea, branca; competição por ligação, cinza; anticorpo cognato.

[0028] **Figura 9: CDC mediado por anticorpos humanizados CD37 e suas variantes em células Daudi.** A capacidade de induzir CDC nas células Daudi de IgG1-004-H5L2, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2 e IgG1-016-H5L2-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de

fluxo.

[0029] **Figura 10: CDC mediado por G28.1 e 37.3 e suas variantes, e CDC em células Daudi mediadas por anticorpos CD37 humanizados com diferentes mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas células Daudi.** (A) A capacidade de induzir CDC nas células Daudi de IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-37.3 e IgG1-37.3-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo. (BC) A capacidade de induzir CDC nas células Daudi de (A) IgG1-010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E345R-K409R, IgG1-010-H5L2-E345K-K409R, IgG1-010-H5L2 -K409R-E430S, IgG1-010-H5L2-RRGY e (B) IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G, IgG1-016-H5L2-E345K-F405L, IgG1-016-H5L2-F405G-E430S 016-H5L2-E345R-F405L foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise (morte máxima, a uma concentração de anticorpo de 10 µg/mL), determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondentes a células PI-positivas) por citometria de fluxo, para um experimento representativo. As barras de erro indicam a variação dentro do experimento (realizado em duplicado).

[0030] **Figura 11: CDC mediado por variantes do anticorpo humanizado IgG1-016-H5L2 nas células Daudi.** A capacidade de induzir CDC em células Daudi de IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G e IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo.

[0031] **Figura 12: CDC mediado por anticorpos biespecíficos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc, (combinações de) anticorpos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc e anticorpos monovalentes de ligação a CD37 com uma mutação para**

melhorar a interação Fc-Fc em células Daudi; e atividade CDC de variantes de anticorpo CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc, e combinações dos mesmos, em células OCI-Ly-7. (A) A capacidade de induzir CDC nas células Daudi de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, uma combinação de Ig -005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-E430. (B) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, uma combinação de IgG1-010-H5L2-E530 016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo. (C) A capacidade de induzir células OCI-Ly-7 do anticorpo biespecífico CD37 bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, o anticorpo bivalente monoespecífico CD37 IgG1-010-H5L2 E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, uma combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G, os anticorpos CD37 monovalentes bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K40-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e uma combinação de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G mais bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo. (D) Valores de EC50 da indução de CDC por bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G mais bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG2-010-H5 -H5L2-E430G, conforme determinado em 2 experimentos independentes. (E) Valores de EC50 da indução de CDC por

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G, conforme determinado em 3 experimentos independentes.

[0032] **Figura 13: CDC mediado por anticorpos CD37 biespecíficos e por anticorpos CD37 biespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc nas células Daudi.** A capacidade de induzir CDC nas células Daudi de (A) bsIgG1-016-H5L2-F405Lx005-H1L2-K409R e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G e (B) H5L2-F405Lx010-H5L2-K409R e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo.

[0033] **Figura 14: CDC mediado por anticorpos biespecíficos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc, (combinações de) anticorpos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc e anticorpos CD37 de ligação monovalente com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc em células tumorais primárias de LLC.** A capacidade de induzir CDC nas células tumorais primárias da LLC (Paciente: VM-BM0091 diagnosticado recentemente/não tratado (BM = derivada da medula óssea)) de (A) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, uma combinação de IgG1-005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, bsIgG1-b5-F5 -H1L2-K409R-E430G e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e (B) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L5 -E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, uma combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G foi determinada *in vitro*. Os dados

mostrados são a % de lise determinada por medição da porcentagem de células mortas (correspondendo a células PI-positivas) por citometria de fluxo.

[0034] **Figura 15: CDC mediado por um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc nas linhagens celulares de linfoma de células B.** A capacidade de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, a uma concentração de 10 µg/mL, de induzir CDC em uma variedade de linhagens celulares de linfoma de células B foi determinada *in vitro*. Os níveis de expressão de CD37 foram determinados por citometria de fluxo quantitativa e são mostrados como moléculas/célula, média ± DP de 2 experimentos. As barras brancas indicam suscetível ao CDC (> 10% de lise, média de 2 experimentos) mediada por bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, as barras pretas indicam inaceitável para CDC (< 10% de média, lise de 2 experimentos) mediadas por bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

[0035] **Figura 16: ADCC mediado por anticorpos biespecíficos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc, (combinações de) anticorpos CD37 com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc e anticorpos CD37 de ligação monovalente com uma mutação para melhorar a interação Fc-Fc em células Daudi e Raji.** A capacidade de induzir ADCC da (A) combinação bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E4030 IgG1-005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G em células Daudi e (B) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, -E430G, IgG1-016-H5L2-E430G e uma combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G em células Daudi e (C) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, uma

combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90L E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G em células Raji foi determinada *in vitro* usando um ensaio de liberação de cromo. Os dados mostrados são % de lise específica; as barras de erro indicam variação no ensaio, com 5 repetições (A, B) ou 6 repetições (C) por ponto de dados.

[0036] **Figura 17: Determinação quantitativa dos níveis de expressão de CD37, CD46, CD55 e CD59 em células tumorais (A) LLC, (B) FL, (C) LCM ou (D) LDGCB.** Os níveis de expressão nas células tumorais foram determinados por citometria de fluxo. A quantidade de antígeno é mostrada como capacidade de ligação ao anticorpo.

[0037] **Figura 18: CDC mediado por um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc em células tumorais primárias de pacientes com LLC, FL, LCM, LDGCB ou B-LNH (ainda não classificado).** A capacidade de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G de induzir CDC em células tumorais derivadas de pacientes com (A) LLC, (B) FL e (C) LCM, LDGCB ou B-LNH (ainda não classificado) foi determinada por citometria de fluxo. A indução de CDC é estabelecida como a porcentagem de lise determinada pela fração de células tumorais positivas para 7-AAD, usando 100 µg/mL (A e B) ou 10 µg/mL (C) de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G.

[0038] **Figura 19: Ligação de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc a células B no sangue humano ou de macaco cinomolgo.** A ligação do bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G marcada com Alexa-488 a células B em sangue (A) humano ou (B) de macaco cinomolgo foi determinada por citometria de fluxo. IgG1-b12 marcada com Alexa-488 foi usada como um anticorpo de controle negativo. Os dados são mostrados como valores geométricos médios de intensidade de fluorescência A488, para um

doador/animal representativo. As barras de erro mostram variação no experimento (medições duplicadas).

[0039] **Figura 20: Citotoxicidade de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc e um anticorpo monoclonal específico CD37 melhorado pela interação FcγR para células B no sangue humano ou de macaco cinomolgo.** (A) Citotoxicidade de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG1-CD37-B2-S239D-I332E para células B no sangue humano e (B) de bsIgG1-016-H5L-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G para células B no sangue de macaco cinomolgo foram determinadas em um ensaio de citotoxicidade no sangue total. IgG1-b12 foi usado como um anticorpo de controle negativo. Os dados são mostrados como % de depleção de células B para um doador/animal representativo. As barras de erro mostram variação no experimento (medições duplicadas).

[0040] **Figura 21: CDC mediado por um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc, um anticorpo específico para CD20 ou uma combinação dos mesmos.** (A a D) A capacidade de induzir CDC em células tumorais derivadas de 2 pacientes com LLC de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, ofatumumab ou uma combinação dos mesmos, nas concentrações indicadas, foi determinada *ex vivo*. Os dados são mostrados como a % de células B viáveis.

[0041] **Figura 22: Relação dose-efeito para 3 doses semanais de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G no modelo JVM-3.** (A) Crescimento tumoral de xenoinxertos JVM-3 após tratamento com doses diferentes de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou anticorpo de controle de isotipo (IgG1-b12). A média e o erro padrão da média (SEM) de cada grupo (n = 10) são mostradas por ponto no tempo. (B) Tamanho do tumor por camundongo no

dia 25. A média e o SEM são indicados por grupo de tratamento. As diferenças foram analisadas pelo teste de Mann Whitney. As diferenças estatisticamente significantes foram indicadas da seguinte forma: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

[0042] **Figura 23: Relação dose-efeito para 3 doses semanais de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G no modelo Daudi-luc.** (A) Crescimento tumoral (medido pela atividade da luciferase, bioluminescência) de xenoenxertos Daudi-luc após tratamento com doses diferentes de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou anticorpo de controle de isotipo (IgG1-b12). A média e o SEM de cada grupo ($n = 9$) são mostrados por ponto no tempo. (B) atividade da luciferase por camundongo no dia 36. Média e SEM são indicados por grupo de tratamento. As diferenças foram analisadas pelo One Way Anova, o LSD de Fisher não corrigido. As diferenças estatisticamente significantes foram indicadas da seguinte forma: **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

[0043] **Figura 24: Concentrações plasmáticas de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG1-b12 após injeção intravenosa em camundongos SCID.** Os camundongos SCID foram injetados com uma única injeção i.v. dose de (A a B) 100 μg (5 mg/kg) ou (C a D) 500 μg (25 mg/kg) de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou IgG1-b12.

[0044] **Figura 25. Análise da ligação de anticorpos CD37 a variantes de CD37 com mutações de alanina nos domínios extracelulares.** A pontuação Z (Zscore) (alteração de dobra) foi definida como $(\text{gMFI}_{\text{normalizado}}[\text{posição aa}] - \mu) / \sigma$, onde μ e σ são a média e o desvio padrão (SD) do gMFI normalizado de todos os mutantes. Os resíduos em que a pontuação Z foi menor que -1,5 (indicado pela linha pontilhada) foram considerados 'perda de mutantes de ligação'. O número acima do eixo x se refere às posições de aminoácidos. Observe que o eixo x não é contínuo: a parte

esquerda (até a linha listrada) do eixo representa resíduos aa na pequena alça extracelular do CD37 humano que não são alaninas ou cisteínas; a parte direita do eixo representa resíduos aa na grande alça extracelular do CD37 humano que não são alaninas ou cisteínas. A linha pontilhada indica uma pontuação Z (alteração de dobra) de -1,5.

[0045] **Figura 26: CDC mediado por misturas de anticorpos CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc mais produtos de anticorpo CD20 estabelecidos clinicamente em células Raji.** Morte mediada por CDC de células Raji (% de lise expressa como a fração celular PI-positiva conforme determinada por citometria de fluxo) para séries de diluição da concentração de anticorpos de 1:0, 3:1, 1:1, 3:1 e 0:1 misturas (concentração final de 10 µg/mL) de anticorpos CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc mais produtos de anticorpos padrão CD20 MabThera (rituximabe), Arzerra (ofatumumab) e Gazyva (obinutuzumabe, GA101): (A) misturas com IgG1 -37.3-E430G, (B) misturas com IgG1-G28.1-E430G, (C) misturas com IgG1-004-E430G, (D) misturas com IgG1-005-E430G, (E) misturas com IgG1-010-E430G e (F) misturas com IgG1-016-E430G.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

[0046] O termo “CD37”, como aqui utilizado, refere-se ao antígeno leucocitário CD37, também conhecido como GP52-40, tetraspanina-26 e TSPAN26, que é uma proteína transmembranar fortemente glicosilada com quatro domínios transmembranares (TMs) e um pequeno e um grande domínio extracelular. A proteína CD37 do Homo sapiens, ou seja, humana, é codificada por uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 62 (proteína CD37 humana: UniprotKB/Swissprot P11049). Nesta sequência de aminoácidos, os resíduos 112 a 241 correspondem ao domínio extracelular grande, os resíduos 39 a 59

ao domínio extracelular pequeno, enquanto os resíduos restantes correspondem aos domínios transmembranar e citoplasmático. A proteína CD37 de *Macaca fascicularis*, ou seja, macaco cinomolgo, é codificada por uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 63 (proteína CDynomolgus CD37: proteína Genbank No. de acesso XP_005589942). A menos que seja contraditado pelo contexto, o termo “CD37” significa “CD37 humano”. O termo “CD37” inclui quaisquer variantes, isoformas e homólogos de espécies de CD37 que são naturalmente expressos por células, incluindo células tumorais, ou são expressos em células transfectadas com o gene CD37 ou cDNA.

[0047] O termo “CD20 humano” ou “CD20” se refere ao CD20 humano (UniProtKB/Swiss-Prot No P11836) e inclui quaisquer variantes, isoformas e homólogos de espécies de CD20 que são naturalmente expressos pelas células, incluindo células tumorais, ou são expressos nas células transfectados com o gene CD20 ou cDNA. Os homólogos das espécies incluem CD20 de macaco rhesus (macaca mulatta; UniProtKB/Swiss-Prot No H9YXP1) e CD20 de macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*).

[0048] O termo “anticorpo de ligação a CD37”, “anticorpo anti-CD37”, “anticorpo de ligação a CD37”, “anticorpo específico para CD37”, “anticorpo CD37” que pode ser usado de forma intercambiável neste documento, refere-se a qualquer anticorpo que se ligue a um epítopo na parte extracelular de CD37.

[0049] O termo “anticorpo” (Ab) no contexto da presente invenção se refere a uma molécula de imunoglobulina, um fragmento de uma molécula de imunoglobulina ou um derivado de qualquer um dos mesmos, que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno em condições fisiológicas típicas com meia-vida de períodos significativos de tempo, como pelo menos cerca de 30 minutos, pelo menos cerca de 45 minutos, pelo menos cerca de uma hora, pelo menos cerca de duas horas, pelo menos cerca de

quatro horas, pelo menos cerca de 8 horas, pelo menos cerca de 12 horas, cerca de 24 horas ou mais, cerca de 48 horas ou mais, cerca de 3, 4, 5, 6, 7 ou mais dias, etc., ou qualquer outro período relevante funcionalmente definido (como um tempo suficiente para induzir, promover, melhorar e/ou modular uma resposta fisiológica associada à ligação do anticorpo ao antígeno e/ou tempo suficiente para o anticorpo recrutar uma atividade efetiva). As regiões variáveis das cadeias pesada e leve da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos (Abs) podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imunológico (como células efectoras) e componentes do sistema complementae, como C1q, o primeiro componente da via clássica de ativação do complemento. Como indicado acima, o termo anticorpo aqui, a menos que indicado de outra forma ou claramente contradito pelo contexto, inclui fragmentos de um anticorpo que são fragmentos de ligação ao antígeno, ou seja, retêm a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação ao antígeno abrangidos pelo termo “anticorpo” incluem (i) um fragmento Fab' ou Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1 ou um anticorpo monovalente, conforme descrito em WO 2007059782 (Genmab) ; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste essencialmente nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste essencialmente nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544 a 546 (1989)), que consiste essencialmente em um domínio VH e também chamados anticorpos de domínio (Holt *et al.*; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21 (11): 484 a 490); (vi) camelídeos ou nanocorpos (Revets *et al.*;

Expert Opinion Biol Ther. 2005 Jan; 5 (1): 111 a 124) e (vii) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam produzidos como uma única cadeia proteica na qual as regiões VL e VH se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como anticorpos de cadeia única ou Fv de cadeia única (scFv), ver, por exemplo, Bird *et al.*, Science 242, 423 426 (1988) e Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879 a 5883 (1988)). Tais anticorpos de cadeia única são abrangidos pelo termo anticorpo, a menos que indicado de outra forma ou claramente indicado pelo contexto. Embora esses fragmentos sejam geralmente incluídos no significado de anticorpo, eles coletivamente e cada um independentemente são características únicas da presente invenção, exibindo diferentes propriedades e utilidades biológicas. Estes e outros fragmentos de anticorpo úteis no contexto da presente invenção, bem como formatos biespecíficos de tais fragmentos, são discutidos mais adiante. Para os anticorpos biespecíficos da invenção, tais fragmentos estão ligados a um domínio Fc. Também deve ser entendido que o termo anticorpo, a menos que especificado de outra forma, também inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), polipeptídeos semelhantes a anticorpos, como anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados, e fragmentos de anticorpos mantendo a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno (fragmentos de ligação ao antígeno) fornecidos por qualquer técnica conhecida, como clivagem enzimática, síntese de peptídeos e técnicas recombinantes. Um anticorpo como gerado pode possuir qualquer isotipo.

[0050] O termo “anticorpo biespecífico” se refere a anticorpos com especificidades para pelo menos dois epítopos diferentes, tipicamente não sobrepostos. Tais epítopos podem estar no mesmo ou em diferentes alvos. Para a presente invenção, os epítopos estão no mesmo alvo, ou seja, CD37.

Exemplos de classes diferentes de anticorpos biespecíficos compreendendo uma região Fc incluem, mas não estão limitados a: moléculas biespecíficas assimétricas, por exemplo, moléculas do tipo IgG com domínios CH3 complementares; e moléculas biespecíficas simétricas, por exemplo, moléculas de direcionamento duplo do tipo IgG recombinante, em que cada região de ligação ao antígeno da molécula se liga a pelo menos dois epítomos diferentes.

[0051] Exemplos de moléculas biespecíficas incluem, entre outros, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO 2002/020039), Knobs-into-Holes (Genentech, WO 1998/50431), CrossMAbs (Roche, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), moléculas Fc-heterodiméricas correspondidas eletrostaticamente (Amgen, EP 1870459 e WO 2009089004; Chugai, US 201000155133; Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (Genentech), corpo DIG, corpo PIG e corpo TIG (Pharmabcine), corpo do domínio de engenharia de troca de cadeia (corpo SEED) (EMD Serono, WO 2007110205), IgG1 e IgG2 biespecíficos (Pfizer/Rinat, WO 2011/143545), andaime azimétrico (Zymeworks/Merck, WO 2012058768), mAb- Fv (Xencor, WO 2011/028952), XmAb (Xencor), anticorpos biespecíficos bivalentes (Roche, WO 2009/080254), IgG biespecífica (Eli Lilly), moléculas DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746), DuetMab (Medimmune, US 2014/0348839), Biclonics (Merus, WO 2013/157953), NovImmune ($\kappa\lambda$ Bodies, WO 2012/023053), Fc Δ Adp (Regeneron, WO 2010/151792), (DT) -Ig (GSK/Domantis), dois Antib Fabs de ação ou dupla ação (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, WO 2008/003116), moléculas Zybody™ (Zyngenia), corpo CovX (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), Domínio Variável Duplo (DVD) -IgTM (Abbott), anticorpos de cabeça dupla de domínio duplo (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US

7.951.918), fusões scFv (Genentech/Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246), TvAb (Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530), Fusões ScFv/Fc, SCORPION (BioSolutions Emergentes/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergente), Tecnologia de Retargeting de Dupla Afinidade (Fc-DARTTM) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diabody (ILCMone/Eli Lilly) e mAbs reticulados quimicamente (Karmanos Cancer Center) e mAbs fundidos covalentemente (AIMM therapeutics).

[0052] O termo “anticorpo completo”, como usado aqui, refere-se a um anticorpo (por exemplo, um anticorpo parental ou variante) que contém todos os domínios constantes e variáveis das cadeias pesada e leve, correspondentes aos que são normalmente encontrados em um anticorpo do tipo selvagem dessa classe ou isotipo.

[0053] O termo “anticorpo quimérico”, como usado aqui, refere-se a um anticorpo em que a região variável é derivada de uma espécie não humana (por exemplo, derivada de roedores) e a região constante é derivada de uma espécie diferente, como a humana. Os anticorpos quiméricos podem ser gerados por engenharia de anticorpos. “Engenharia de anticorpos” é um termo genérico usado para diferentes tipos de modificações de anticorpos e que é um processo bem conhecido do especialista. Em particular, um anticorpo quimérico pode ser gerado usando técnicas de DNA padrão, como descrito em Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, C. 15. Assim, o anticorpo quimérico pode ser um anticorpo recombinante de engenharia genética ou enzimática. Está dentro do conhecimento da pessoa versada na técnica gerar um anticorpo quimérico e, portanto, a geração do anticorpo quimérico de acordo com a presente invenção pode ser realizada por outros métodos além dos aqui descritos. Os anticorpos monoclonais quiméricos para aplicações terapêuticas são desenvolvidos para reduzir a imunogenicidade do anticorpo. Eles podem

tipicamente conter regiões variáveis não humanas (por exemplo, murinas), que são específicas para o antígeno de interesse, e domínios de cadeia pesada e leve de anticorpos humanos constantes. Os termos “região variável” ou “domínios variáveis”, conforme utilizados no contexto de anticorpos quiméricos, refere-se a uma região que compreende as CDRs e as regiões estruturais das cadeias pesada e leve da imunoglobulina.

[0054] O termo “oligômero”, como usado aqui, refere-se a uma molécula que consiste em mais de uma, mas um número limitado de unidades de monômero (por exemplo, anticorpos) em contraste com um polímero que, pelo menos em princípio, consiste em um número ilimitado de monômeros. Oligômeros exemplares são dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Da mesma forma, “oligomerização”, como por exemplo, “hexamerização”, como aqui utilizado, significa que há um aumento na distribuição de anticorpos e/ou outras proteínas diméricas compreendendo regiões de ligação ao alvo de acordo com a invenção em oligômeros, como hexâmeros. O aumento da formação de oligômeros como hexâmeros é devido ao aumento da interação Fc-Fc após a ligação a alvos ligados à membrana.

[0055] O termo “região que se liga ao antígeno”, “região de ligação ao antígeno”, “região de ligação” ou domínio de ligação ao antígeno, como aqui utilizado, refere-se a uma região de um anticorpo que é capaz de se ligar ao antígeno. Essa região de ligação é tipicamente definida pelos domínios VH e VL do anticorpo que podem ser subdivididos em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis em sequência e/ou forma de laços (loops) estruturalmente definidos), também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FRs). O antígeno pode ser qualquer molécula, como um polipeptídeo, por exemplo, presente em uma célula, bactéria ou vírus ou em solução. Os termos “antígeno” e “alvo” podem, a menos que sejam contraditos pelo

contexto, ser usados de forma intercambiável no contexto da presente invenção.

[0056] O termo “alvo”, como usado aqui, refere-se a uma molécula à qual a região de ligação ao antígeno do anticorpo se liga. O alvo inclui qualquer antígeno para o qual o anticorpo gerado é direcionado. O termo “antígeno” e “alvo” pode, em relação a um anticorpo, ser usado de forma intercambiável e constituir o mesmo significado e objetivo em relação a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção.

[0057] O termo “anticorpo humanizado”, como usado aqui, refere-se a um anticorpo não humano geneticamente modificado, que contém domínios constantes de anticorpos humanos e domínios variáveis não humanos modificados para conter um alto nível de homologia de sequência com domínios variáveis humanos. Isso pode ser conseguido enxertando as seis regiões determinantes da complementaridade de anticorpos não humanos (CDRs), que juntas formam o local de ligação ao antígeno, em uma região de estrutura aceitadora humana homóloga (FR) (ver WO 92/22653 e EP 0629240). A fim de reconstituir completamente a afinidade e especificidade de ligação do anticorpo parental, pode ser necessária a substituição de resíduos estruturais do anticorpo parental (ou seja, o anticorpo não humano) nas regiões estruturais humanas (mutações reversas). A modelagem de homologia estrutural pode ajudar a identificar os resíduos de aminoácidos nas regiões estruturais que são importantes para as propriedades de ligação do anticorpo. Assim, um anticorpo humanizado pode compreender sequências de CDR não humanas, principalmente regiões estruturais humanas, opcionalmente compreendendo uma ou mais mutações reversas de aminoácidos na sequência de aminoácidos não humanos e regiões constantes totalmente humanas. Opcionalmente, modificações adicionais de aminoácidos, que não são necessariamente mutações reversas, podem ser aplicadas para obter um anticorpo humanizado com características preferidas,

como afinidade e propriedades bioquímicas.

[0058] Os anticorpos humanizados podem ser gerados usando coelhos imunizados, humanização de anticorpos de coelho usando a tecnologia de humanização da linhagem germinativa (enxerto de CDR) e, se necessário, por resíduos de mutação reversa que podem ser críticos para as propriedades de ligação ao anticorpo, como identificado na modelagem estrutural, para resíduos de coelho. A triagem para potenciais epítomos de células T pode ser aplicada.

[0059] O termo “anticorpo humano”, como usado aqui, refere-se a anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo “anticorpo humano”, como aqui utilizado, não se destina a incluir anticorpos nos quais sequências CDR derivadas da linhagem germinativa de outras espécies de mamíferos, como um camundongo, foram enxertadas nas sequências estruturais humanas. Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo a metodologia convencional de anticorpos monoclonais, por exemplo, a técnica de hibridação de células somáticas padrão de Kohler e Milstein, Nature 256: 495 (1975). Embora os procedimentos de hibridação de células somáticas sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais podem ser empregadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B ou técnicas de exibição de fagos usando bibliotecas de genes de anticorpos humanos.

[0060] Um sistema animal adequado para a preparação de hibridomas que secretam anticorpos monoclonais humanos é o sistema murino. A

produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

[0061] Os anticorpos monoclonais humanos podem ser gerados usando, por exemplo, camundongos ou coelhos transgênicos ou transcromossômicos que transportam partes do sistema imunológico humano, em vez de camundongos ou coelhos.

[0062] O termo “imunoglobulina” se refere a uma classe de glicoproteínas estruturalmente relacionadas que consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas, um par de cadeias leves (L) de baixo peso molecular e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro interconectadas por ligações dissulfeto. A estrutura das imunoglobulinas foi bem caracterizada. Ver, por exemplo, Fundamental Immunology C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Resumidamente, cada cadeia pesada é tipicamente composta por uma região variável da cadeia pesada (aqui abreviada como VH ou V_H) e uma região constante da cadeia pesada (aqui abreviada como CH ou C_H). A região constante da cadeia pesada é tipicamente composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é tipicamente composta por uma região variável da cadeia leve (aqui abreviada como VL ou V_L) e uma região constante da cadeia leve (abreviada aqui como CL ou C_L). A região constante da cadeia leve é tipicamente composta por um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis em sequência e/ou forma de laços estruturalmente definidos), também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões mais conservadas, regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é tipicamente composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino ao terminal carboxi na seguinte

ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver também Chothia e Lesk J. Mol Biol 196, 901917 (1987)). Salvo indicação em contrário ou contradito pelo contexto, as sequências de CDR neste documento são identificadas de acordo com as regras do IMGT (Brochet X., Nucl Acids Res. 2008; 36: W503-508 e Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209 a 212; consulte também endereço http da Internet <http://www.imgt.org/>). Salvo indicação em contrário ou contradito pelo contexto, a referência às posições de aminoácidos nas regiões constantes da presente invenção está de acordo com a numeração da UE (Edelman *et al.*, Proc Natl Acad Sci US A. 1969 May; 63 (1): 78 a 85; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição. 1991 Publicação NIH No. 91-3242).

[0063] Quando usado aqui, a menos que seja contradito pelo contexto, o termo “braço Fab” ou “braço” se refere a um par de cadeia pesada-cadeia leve e é usado de forma intercambiável com “meias moléculas” neste documento. Por conseguinte, um “braço Fab” compreende as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, bem como a região constante da cadeia leve e a região constante da cadeia pesada que compreende a região CH1, a dobradiça, a região CH2 e a região CH3 de uma imunoglobulina. A “região CH1” se refere, por exemplo, à região de um anticorpo IgG1 humano correspondente aos aminoácidos 118-215 de acordo com a numeração da UE. Assim, o fragmento Fab compreende a região de ligação de uma imunoglobulina.

[0064] O termo “região cristalizável de fragmento”, “região Fc”, “fragmento Fc” ou “domínio Fc”, que pode ser usado de forma intercambiável neste documento, refere-se a uma região de anticorpo compreendendo, disposta do terminal amino ao terminal carboxi, pelo menos uma região de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Uma região Fc de um anticorpo IgG1 pode, por exemplo, ser gerada por digestão de um anticorpo IgG1 com papaína. A região Fc de um anticorpo pode mediar a ligação da

imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imunológico (como células efectoras) e componentes do sistema de complementar, como C1q, o primeiro componente na via clássica de ativação do complemento. O termo “região de charneira”, como aqui utilizado, destina-se a se referir à região de charneira de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região de charneira de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 216-230 de acordo com a numeração da UE.

[0065] O termo “dobradiça do núcleo” ou “região da dobradiça do núcleo”, conforme aqui utilizado, refere-se aos quatro aminoácidos correspondentes às posições 226-229 de um anticorpo IgG1 humano.

[0066] O termo “região CH2” ou “domínio CH2”, como aqui utilizado, destina-se a referir a região CH2 de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região CH2 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 231-340 de acordo com a numeração da UE. No entanto, a região CH2 também pode ser qualquer um dos outros isotipos ou alotipos, como aqui descrito.

[0067] O termo “região CH3” ou “domínio CH3”, conforme aqui utilizado, destina-se a se referir à região CH3 de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região CH3 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 341-447 de acordo com a numeração da UE. No entanto, a região CH3 também pode ser qualquer um dos outros isotipos ou alotipos, como aqui descrito.

[0068] Como aqui utilizado, o termo “isotipo” se refere à classe de imunoglobulina (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE ou IgM) que é codificada pelos genes da região constante da cadeia pesada.

[0069] O termo “anticorpo monovalente” significa, no contexto da presente invenção, que uma molécula de anticorpo é capaz de se ligar a uma única molécula do antígeno e, portanto, não é capaz de reticulação de

antígeno.

[0070] Um “anticorpo CD37” ou “anticorpo anti-CD37” é um anticorpo como descrito acima, que se liga especificamente ao antígeno CD37.

[0071] Um “anticorpo CD37xCD37” ou “anticorpo anti-CD37xCD37” é um anticorpo biespecífico, que compreende duas regiões diferentes de ligação ao antígeno, uma das quais se liga especificamente a um primeiro epítopo no antígeno CD37 e uma segunda que se liga especificamente a um epítopo diferente na CD37.

[0072] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico da invenção é isolado. Um “anticorpo biespecífico isolado”, como aqui utilizado, pretende se referir a um anticorpo biespecífico que é substancialmente livre de outros anticorpos com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo biespecífico isolado que se liga especificamente a CD37 está substancialmente livre de anticorpos monoespecíficos que especificamente se ligam a CD37).

[0073] O termo “epítopo” significa um determinante da proteína capaz de se ligar a uma região de ligação ao antígeno de um anticorpo (“paratope”). Os epítopos geralmente consistem em agrupamentos de superfície de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características específicas de carga. Epítopos conformacionais e não conformacionais são diferenciados pelo fato de a ligação ao primeiro, mas não o último, ser perdida na presença de solventes desnaturantes. As técnicas de mapeamento de epítopos podem determinar “epítopos estruturais” ou “epítopos funcionais”. Epítopos estruturais são definidos como os resíduos dentro de uma estrutura que estão em contato direto com o anticorpo e podem, por exemplo, ser avaliados por métodos baseados em estruturas, como cristalografia de raios-X. Um epítopo estrutural pode compreender resíduos

de aminoácidos diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo, bem como outros resíduos de aminoácidos, que não estão diretamente envolvidos na ligação, como resíduos de aminoácidos efetivamente bloqueados ou cobertos pelo anticorpo (em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro do rastro do anticorpo). Epítipo funcional é definido como os resíduos que fazem contribuições energéticas para a interação de ligação antígeno-anticorpo e podem, por exemplo, ser avaliados por mutagênese dirigida ao local, como a varredura de alanina (Cunningham, BC, & Wells, JA (1993) *Journal of Molecular Biology*; Clackson, T. & Wells, J. (1995) *Science*, 267 (5196), 383 a 386). Um epítipo funcional pode compreender resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo, bem como outros resíduos de aminoácidos que não estão diretamente envolvidos na ligação, como resíduos de aminoácidos que causam alterações conformacionais na localização dos resíduos envolvidos em interações diretas (Greenspan, NS, & Di Cera, E. (1999) *Nature Biotechnology*, 17 (10), 936 a 937). No caso de interações anticorpo-antígeno, o epítipo funcional pode ser usado para distinguir moléculas de anticorpo entre si. Um epítipo funcional pode ser determinado pelo uso do método de varredura de alanina, como descrito no Exemplo 17. Assim, os aminoácidos na proteína podem ser substituídos por alaninas, gerando assim uma série de proteínas mutantes, a ligação da região de ligação ao antígeno do anticorpo à proteína mutante é reduzida em comparação com uma proteína do tipo selvagem; a ligação reduzida sendo determinada como log padronizado (alteração de dobra) (expressa como pontuação z) na ligação do referido anticorpo sendo menor que -1,5, conforme estabelecido no Exemplo 17.

[0074] O termo “anticorpo monoclonal” como aqui utilizado se refere a uma preparação de moléculas de anticorpo essencialmente de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade e afinidade de ligação única para um epítipo particular. Por

consequente, o termo “anticorpo monoclonal humano” se refere a anticorpos que exibem uma especificidade de ligação única que possui regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos monoclonais humanos podem ser gerados por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico ou transcromossômico, como um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve, fundido a uma célula imortalizada.

[0075] Como aqui utilizado, o termo “ligação” no contexto da ligação de um anticorpo a um antígeno predeterminado é tipicamente uma ligação com uma afinidade correspondente a um K_D de cerca de 10^{-6} M ou menos, por exemplo, 10^{-7} M ou menos, tal como cerca de 10^{-8} M ou menos, tal como cerca de 10^{-9} M ou menos, cerca de 10^{-10} M ou menos, ou cerca de 10^{-11} M ou até menos quando determinado por, por exemplo, tecnologia BioLayer Interferometry (BLI) em um instrumento Octet HTX usando o anticorpo como o ligante e o antígeno como o analito, e em que o anticorpo se liga ao antígeno predeterminado com uma afinidade correspondente a um K_D que é pelo menos dez vezes mais baixo, tal como pelo menos 100 vezes mais baixo, por exemplo, pelo menos 1.000 vezes mais baixo, tal como pelo menos 10.000 vezes mais baixo, por exemplo, pelo menos 100.000 vezes mais baixo que o seu K_D de ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) que não seja o antígeno predeterminado ou um antígeno estreitamente relacionado. A quantidade com a qual o K_D de ligação é menor depende do K_D do anticorpo, de modo que quando o K_D do anticorpo é muito baixo, a quantidade com a qual o K_D de ligação ao antígeno é menor que o K_D da ligação a um antígeno não específico pode ser pelo menos 10.000 vezes (ou seja, o anticorpo é altamente específico).

[0076] O termo “ K_D ” (M), tal como aqui utilizado, refere-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno

particular.

[0077] “Afinidade”, tal como aqui utilizado, e “ K_D ” estão inversamente relacionados, ou seja, maior afinidade se refere a K_D mais baixo e menor afinidade se refere a K_D mais alto.

[0078] Conforme usado neste documento, um anticorpo que “concorre” ou “concorre de forma cruzada” é usado de forma intercambiável com um anticorpo que “bloqueia” ou “bloqueia de forma cruzada” outro anticorpo, ou seja, um anticorpo de referência e significa que o anticorpo e o anticorpo de referência competem pela ligação ao CD37 humano, por exemplo, como determinado no ensaio descrito no exemplo 7 deste documento. Em uma modalidade, o anticorpo se liga com menos de 50%, tal como menos de 20%, tal como menos de 15% de sua ligação máxima na presença do anticorpo de referência concorrente.

[0079] Como usado aqui, um anticorpo que “não compete” ou “não compete de forma cruzada” ou “não bloqueia” outro anticorpo, ou seja, um anticorpo de referência, significa que o anticorpo e o anticorpo de referência não competem pela ligação ao CD37 humano, por exemplo, como determinado no ensaio descrito no exemplo 7 deste documento. Para alguns pares de anticorpo e anticorpo de referência, a não competição no ensaio do exemplo 7 é observada apenas quando um anticorpo está ligado a um antígeno em uma célula e o outro é usado para competir, e não vice-versa. O termo “não concorre com” ou “não concorrência” ou “não bloqueio”, quando usado aqui, também se destina a cobrir essas combinações de anticorpos. Em uma modalidade, o anticorpo se liga com pelo menos 75%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 85% da sua ligação máxima na presença do anticorpo de referência.

[0080] O termo “mutação que melhora a interação Fc-Fc”, tal como usado aqui, refere-se a uma mutação nos anticorpos IgG que fortalece as interações Fc-Fc entre os anticorpos IgG vizinhos que estão ligados a um alvo

da superfície celular. Isto pode resultar na formação de oligômeros melhorada, tal como, por exemplo, hexamerização dos anticorpos ligados ao alvo, enquanto as moléculas de anticorpo permanecem monoméricas em solução, conforme descrito em WO 2013/004842 e WO 2014/108198, ambos os quais são aqui incorporados por referência.

[0081] O termo “funções efetoras de Fc” ou “funções efetoras mediadas por Fc”, tal como usado aqui, destina-se a se referir a funções que são uma consequência da ligação de um polipeptídeo ou anticorpo ao seu alvo, tal como um antígeno, em uma membrana celular e interação subsequente do domínio IgG Fc com moléculas do sistema imunológico inato (por exemplo, moléculas solúveis ou moléculas ligadas à membrana). Exemplos de funções efetoras de Fc incluem (i) ligação a C1q, (ii) ativação do complemento, (iii) citotoxicidade dependente do complemento (CDC), (iv) citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), (v) ligação ao receptor Fc-gama, (vi) fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), (vii) citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC), (viii) citotoxicidade aumentada por complemento, (ix) ligação para complementar o receptor de um anticorpo opsonizado mediado pelo anticorpo, (x) opsonização e (xi) uma combinação de qualquer um de (i) a (x).

[0082] Quando usado aqui, o termo “interação heterodimérica entre a primeira e a segunda região CH3” se refere à interação entre a primeira região CH3 da primeira região Fc e a segunda região CH3 da segunda região Fc em uma proteína heterodimérica de primeira CH3/segunda CH3. Um anticorpo biespecífico é um exemplo de uma proteína heterodimérica.

[0083] Quando usado aqui, o termo “interações homodiméricas da primeira e da segunda regiões CH3” se refere à interação entre uma primeira região CH3 e outra primeira região CH3 em uma primeira proteína homodimérica CH3/primeira CH3 e a interação entre uma segunda região CH3 e outra segunda região CH3 em uma segunda proteína homodimérica

CH3/segunda CH3. Um anticorpo monoclonal é um exemplo de uma proteína homodimérica.

[0084] O termo “condições de redução” ou “ambiente de redução” se refere a uma condição ou ambiente em que um substrato, tal como, por exemplo, um resíduo de cisteína na região de dobradiça de um anticorpo é mais provável que seja reduzido do que oxidado.

[0085] A presente invenção também fornece anticorpos biespecíficos compreendendo variantes funcionais das regiões VL, regiões VH ou uma ou mais CDRs dos anticorpos biespecíficos dos exemplos. Uma variante funcional de uma VL, VH ou CDR usada no contexto de um anticorpo biespecífico ainda permite que cada braço do anticorpo biespecífico retenha pelo menos uma proporção substancial (pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais) da afinidade e/ou da especificidade/seletividade do anticorpo biespecífico parental e, em alguns casos, esse anticorpo biespecífico pode estar associado a uma maior afinidade, seletividade e/ou especificidade do que o anticorpo biespecífico parental. Tais variantes funcionais retêm tipicamente uma identidade de sequência significativa para o anticorpo biespecífico parental. A porcentagem de identidade entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (ou seja, % de homologia = número de posições idênticas/número total de posições x 100), levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna, que precisa ser introduzida para o alinhamento ideal das duas sequências. A identidade percentual entre duas sequências nucleotídicas ou de aminoácidos pode, por exemplo, ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), que foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando Needleman

e Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444 a 453 (1970).

[0086] Exemplos de variantes incluem aqueles que diferem das regiões VH e/ou VL e/ou CDR das sequências de anticorpos biespecíficas parentais principalmente por substituições conservadoras; por exemplo, 10, tal como 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 das substituições na variante são substituições conservadoras de resíduos de aminoácidos. De preferência, uma variante contém no máximo 10 substituições de aminoácidos na região VH e/ou VL do anticorpo parental, tal como no máximo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou no máximo 1 substituição de aminoácidos. De preferência, tais substituições são substituições conservadoras, especialmente se as substituições estiverem em uma sequência CDR.

[0087] No contexto da presente invenção, substituições conservadoras podem ser definidas por substituições dentro das classes de aminoácidos refletidas na tabela a seguir:

Classes de resíduos de aminoácidos para substituições conservadoras

Resíduos ácidos	Asp (D) e Glu (E)
Resíduos básicos	Lys (K), Arg (R), e His (H)
Resíduos não carregados hidrofílicos	Ser (S), Thr (T), Asn (N), e Gln (Q)
Resíduos não carregados alifáticos	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), e Ile (I)
Resíduos não carregados não polares	Cys (C), Met (M), e Pro (P)
Resíduos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y), e Trp (W)

[0088] No contexto da presente invenção, as seguintes notações são, a menos que indicado de outra forma, usadas para descrever uma mutação; i) a substituição de um aminoácido em uma determinada posição é escrita como, por exemplo, K409R que significa uma substituição de uma Lisina na posição 409 por uma Arginina; e ii) para variantes específicas, são utilizados os códigos específicos de três ou uma letra, incluindo os códigos Xaa e X para indicar qualquer resíduo de aminoácido. Assim, a substituição de Lisina por Arginina na posição 409 é designada como: K409R, e a substituição de Lisina por qualquer resíduo de aminoácido na posição 409 é designada como K409X. Em caso de deleção de Lisina na posição 409, é indicado por K409*.

[0089] O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente

“célula hospedeira”), tal como aqui utilizado, pretende se referir a uma célula na qual um vetor de expressão foi introduzido, por exemplo, um vetor de expressão que codifica um anticorpo da invenção. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 ou NS0 e células linfocíticas.

[0090] O termo “tratamento” se refere à administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo biespecífico terapeuticamente ativo da presente invenção com o objetivo de aliviar, melhorar, interromper ou erradicar (curar) sintomas ou estados de doença.

[0091] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo biespecífico pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo biespecífico de provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção de anticorpo são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

[0092] O termo “anticorpo anti-idiotípico” se refere a um anticorpo que reconhece determinantes únicos geralmente associados ao local de ligação ao antígeno de um anticorpo.

Modalidades da invenção

[0093] Em uma primeira modalidade principal, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno que se ligam ao CD37 humano com a sequência da SEQ ID NO: 62 e uma primeira e uma segunda regiões Fc de uma imunoglobulina humana, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno se ligam a diferentes epítomos no CD37 e em que a primeira e a

segunda regiões Fc compreendem uma ou mais mutações de aminoácidos cuja(s) mutação(ões) aprimora(m) a interação Fc-Fc entre os anticorpos biespecíficos após a ligação a alvos ligados à membrana em comparação com a interação Fc- Fc entre anticorpos biespecíficos que não possuem as referidas mutações. Por este meio, é fornecido um anticorpo anti-CD37 biespecífico que se liga a dois epítomos diferentes em CD37. De preferência, os dois epítomos são tais que ambos os braços de ligação podem se ligar à mesma proteína e, portanto, de modo que cada braço de ligação não bloqueie a ligação do outro braço e/ou não concorra pela ligação com o outro braço de ligação da molécula biespecífica. Além disso, o anticorpo biespecífico compreende uma mutação que melhora a interação Fc-Fc entre dois ou mais dos anticorpos biespecíficos da invenção. Isto tem o efeito de que as moléculas biespecíficas formam oligômeros após a ligação a CD37 expressa na membrana plasmática da célula alvo. A interação Fc-Fc é melhorada em comparação com uma molécula que é idêntica, exceto pela mutação. De um modo preferido, a mutação está na região Fc da molécula biespecífica. Em uma modalidade, é uma única substituição de aminoácidos na região Fc da molécula biespecífica. É de um modo preferido uma substituição simétrica, o que significa que ambas as meias moléculas (anticorpos parentais) têm a mutação. É uma vantagem adicional do presente anticorpo biespecífico que ele possui funções efetoras CDC e/ou ADCC melhoradas em comparação com uma molécula biespecífica idêntica que não possui a mutação que melhora a interação Fc-Fc. Surpreendentemente, a molécula biespecífica também melhorou o CDC e/ou ADCC em comparação com uma combinação dos dois anticorpos anti-CD37 monoclonais parentais que são mutados para ter interações Fc-Fc melhoradas e CDC e/ou ADCC melhorados em comparação com os anti-monoclonais parentais. Anticorpo CD37 que é mutado para ter interações Fc-Fc melhoradas por si só. Assim, o anticorpo biespecífico da invenção é mais potente na indução de CDC e/ou ADCC do

que uma combinação de um anticorpo com a primeira região de ligação ao antígeno e um segundo anticorpo com a segunda região de ligação ao antígeno e onde ambos os anticorpos compreendem a mutação que aprimora a interação Fc-Fc, ou comparada com os anticorpos monoclonais anti-CD37 possuindo a primeira ou a segunda regiões de ligação ao antígeno e que compreendem a mutação que aprimora a interação Fc-Fc.

[0094] Em uma modalidade da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,
sequência VL CDR2: KAS, e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010].

[0095] De preferência, a competição pela ligação é determinada de acordo com o exemplo 7.

[0096] Em outra modalidade, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,
sequência VL CDR2: KAS, e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010].

[0097] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências de

CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,
 sequência VL CDR2: KAS, e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 **[010]**.

[0098] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico da invenção compreende as sequências VH e VL:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 15 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 19 ou

(ii) sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e as sequências VL das SEQ ID Nos: 15 e 19.

[0099] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 que compreende as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
 sequência VL CDR2: AAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 **[005]**.

[00100] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região

de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
 sequência VL CDR2: AAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

[00101] Em uma modalidade da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico possui um epítipo funcional que compreende um ou mais dos aminoácidos Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 e P199 da SEQ ID NO: 62 (CD37).

[00102] Em uma modalidade da invenção, a referida primeira região de ligação ao antígeno se liga a um epítipo funcional que compreende um ou mais dos aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 e P199 da SEQ ID NO: 62 (CD37).

[00103] Em uma modalidade da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga a um epítipo funcional no CD37, em que a ligação a um CD37 mutante no qual qualquer um ou mais aminoácidos residem nas posições correspondentes às posições Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 e P199 da SEQ ID NO: 62 (CD37), foi/foram substituída(s) por alaninas, é reduzida em comparação com CD37 do tipo selvagem possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 62; a ligação reduzida sendo determinada como pontuação Z (alteração de dobra) na ligação do referido anticorpo sendo reduzida em -1,5, em que a pontuação Z (alteração de dobra) na ligação é calculada conforme estabelecido no Exemplo 17.

[00104] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região

de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
 sequência VL CDR2: AAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

[00105] Em uma modalidade adicional da invenção, a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 8 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 12 ou

(ii) sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e as sequências VL das SEQ ID NOs: 8 e 12.

[00106] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR selecionadas do grupo compreendendo:

(i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
 sequência VL CDR2: YAS e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**

(ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,

sequência VL CDR2: EAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**

(iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,

sequência VL CDR2: FAK e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,

sequência VL CDR2: IVA e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00107] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,

sequência VL CDR2: YAS e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**

(ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,

sequência VL CDR2: EAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**

(iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,

sequência VL CDR2: FAK e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,

sequência VL CDR2: IVA e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00108] Anticorpos biespecíficos são fornecidos em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno se ligam a diferentes epítomos no CD37 humano. Os inventores da presente invenção constataram que os anticorpos que possuem as sequências CDR do anticorpo 005 (SEQ ID NOs 9, 10, 11 e 13, 13a, 14) e anticorpo 010 (SEQ ID NOs 16, 17, 18 e 20, 20a, 21) competem pela ligação ao CD37 humano e não competem pela ligação ao CD37 com qualquer um dos anticorpos que possuem as sequências CDR do anticorpo 016 (SEQ ID NOs 23, 24, 25 e 27, 27a, 28), 004 (SEQ ID NOs 2, 3, 4 e 6, 6a, 7), G28.1 (SEQ ID NOs 40, 41, 42 e 44, 44a, 45) e 37.3 (SEQ ID

NOs 47, 48, 49 e 51, 51a, 52). No entanto, verificou-se que os anticorpos 016, 004, G28.1 e 37.3 competem entre si pela ligação ao CD37 humano. Assim, um anticorpo biespecífico compreendendo um primeiro braço de ligação que é obtido a partir de um anticorpo que compete pela ligação com um ou ambos os anticorpos 005 ou 010 e um segundo braço de ligação que é obtido a partir de um anticorpo que compete pela ligação com qualquer um dos 016, 004, G28.1 e 37.3 ou com todos estes é um anticorpo biespecífico que tem especificidade para dois epítomos diferentes em CD37. Os inventores constataram surpreendentemente que esses anticorpos biespecíficos têm potência CDC favorável nas células que expressam CD37 em comparação com o tratamento dessas células com uma combinação dos dois anticorpos monoclonais que não competem pela ligação a CD37. Adicionalmente, os inventores constataram surpreendentemente que esses anticorpos biespecíficos têm potência ADCC favorável nas células que expressam CD37 em comparação com o tratamento dessas células com uma combinação dos dois anticorpos monoclonais que não competem pela ligação a CD37.

[00109] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo com as sequências CDR do anticorpo 010 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 016.

[00110] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo que possui as sequências CDR do anticorpo 010 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 004.

[00111] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico

compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo que possui as sequências CDR do anticorpo 010 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de G28.1.

[00112] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo que possui as sequências CDR do anticorpo 010 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 37.3.

[00113] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação à CD37 humana com um anticorpo com as sequências CDR do anticorpo 005 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 016.

[00114] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo com as sequências CDR do anticorpo 005 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 004.

[00115] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo com as sequências CDR do anticorpo 005 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de G28.1.

[00116] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação ao antígeno que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo com as sequências CDR do anticorpo 005 e uma segunda região de ligação que é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com o anticorpo que possui as sequências CDR de 37.3.

[00117] Tais anticorpos biespecíficos descritos aqui podem, em outras modalidades, compreender uma substituição que melhora a interação Fc-Fc em ambas as regiões Fc (ou seja, as regiões Fc obtidas a partir do primeiro e do segundo anticorpo parental) do anticorpo biespecífico em que a substituição corresponde a E430G em IgG1 ao usar a numeração da UE e cuja substituição melhora a interação Fc-Fc de dois ou mais anticorpos biespecíficos da invenção após ligação ao alvo ligado à membrana. Em outra modalidade, a substituição que melhora a interação Fc-Fc corresponde a E345K em IgG1 ao usar a numeração da UE.

[00118] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma segunda região de ligação ao antígeno que se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que compreende:

- (i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
 sequência VL CDR2: YAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**
- (ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,

sequência VL CDR2: EAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**

(iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,

sequência VL CDR2: FAK e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,

sequência VL CDR2: IVA e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00119] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico compreende uma segunda região de ligação ao antígeno que se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

a. sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,

sequência VL CDR2: YAS e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**

b. sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,

sequência VL CDR2: EAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**

c. sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,

sequência VL CDR2: FAK e

sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

d. sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,

sequência VL CDR2: IVA e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00120] Em uma modalidade da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico possui um epítipo funcional compreendendo um ou mais dos aminoácidos E124, F162, Q163, V164, L165 e H175 da SEQ ID NO: 62 (CD37).

[00121] Em uma modalidade da invenção, a referida segunda região de ligação ao antígeno se liga a um epítipo funcional que compreende um ou mais dos aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: E124, F162, Q163, V164, L165 e H175 da SEQ ID NO: 62 (CD37).

[00122] Em uma modalidade da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga a um epítipo funcional no CD37, em que a ligação a um CD37 mutante no qual qualquer um ou mais aminoácidos residem nas posições correspondentes às posições E124, F162, Q163, V164, L165 e H175 da SEQ ID No: 62 (CD37), foi/foram substituída(s) por alaninas, é reduzida em comparação com CD37 do tipo

selvagem possuindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 62; a ligação reduzida sendo determinada como pontuação Z (alteração de dobra) na ligação do referido anticorpo sendo reduzida em -1,5, em que a pontuação Z (alteração de dobra) na ligação é calculada conforme estabelecido no Exemplo 17.

[00123] Por conseguinte, em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 010 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 016.

[00124] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 010 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 004.

[00125] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 010 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo G28.1.

[00126] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 010 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 37.3.

[00127] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 005 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 016.

[00128] Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 005 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 004.

[00129] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 005 e em que a

segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo G28.1.

[00130] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 005 e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 compreendendo as sequências CDR do anticorpo 37.3.

[00131] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que compreende:

- (i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
sequência VL CDR2: YAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**
- (ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,
sequência VL CDR2: EAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**
- (iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,
 sequência VL CDR2: FAK e
 sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

(v) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,
 sequência VL CDR2: IVA e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00132] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

(i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
 sequência VL CDR2: YAS e
 sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]**
 (ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,
 sequência VL CDR2: EAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7; **[004]**
 (iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,

sequência VL CDR2: FAK e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45; **[G28.1]**

e

(vi) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,

sequência VL CDR2: IVA e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52. **[37.3]**

[00133] Por conseguinte, a presente invenção também fornece em outra modalidade um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 16 a 18 e 20 a 21) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 016 (ou seja, SEQ ID NOs 23 a 25 e 27 a 28). Como também descrito acima, esse anticorpo biespecífico da invenção compreende adicionalmente uma mutação que melhora a interação Fc-Fc na região Fc do anticorpo. Em uma modalidade, esta mutação corresponde a uma mutação na posição E430 ou E345 em IgG1 quando se utiliza o sistema de numeração da UE. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição de E430G. Em outra modalidade, é uma substituição E345K

[00134] A presente invenção também fornece em outra modalidade um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 16 a 18 e 20 a 21) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 004 (ou seja, SEQ ID NOs 2 a 4 e 6 a 7).

[00135] A presente invenção também fornece em outra modalidade um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 16 a 18 e 20 a 21) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo G28.1 (ou seja, SEQ ID NOs 40 a 42 e 44 a 45).

[00136] A presente invenção também fornece em outra modalidade um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 16 a 18 e 20 a 21) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências CDR do anticorpo 37.3 (ou seja, SEQ ID NOs 47 a 49 e 51 a 52).

[00137] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL selecionadas do grupo que compreende:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 22 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 26 **[016]** ou

(ii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 1 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 5 **[004]** ou

(iii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 39 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 43 **[G28.1]** ou

(iv) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 46 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 50 **[37.3]** ou

uma sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% identidade, tal

como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e a sequência VL, respectivamente, conforme estabelecido em qualquer um de (i) a (iv).

[00138] Em uma modalidade adicional da invenção, a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL selecionadas do grupo que consiste em:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 22 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 26 **[016]**,

(ii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 1 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 5 **[004]**,

(iii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 39 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 43 **[G28.1]**,

(iv) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 46 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 50 **[37.3]** e

uma sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e a sequência VL, respectivamente, conforme estabelecido em qualquer um de (i) a (iv).

[00139] Assim, em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 15 e 19) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 016 (ou seja, SEQ ID NOs 22 e 26).

[00140] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um

anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID Nos 15 e 19) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 004 (ou seja, SEQ ID NOs 1 e 5).

[00141] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 15 e 19) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo G28.1 (ou seja, SEQ ID NOs 39 e 43).

[00142] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 010 (ou seja, SEQ ID NOs 15 e 19) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 37.3 (ou seja, SEQ ID NOs 46 e 50).

[00143] Em ainda outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 005 (ou seja, SEQ ID NOs 8 e 12) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 016 (ou seja, SEQ ID NOs 22 e 26).

[00144] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões

de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 005 (ou seja, SEQ ID NOs 8 e 12) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 004 (ou seja, SEQ ID NOs 1 e 5).

[00145] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 005 (ou seja, SEQ ID NOs 8 e 12) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo G28.1 (ou seja, SEQ ID NOs 39 e 43).

[00146] Em outra modalidade, a presente invenção também fornece um anticorpo biespecífico compreendendo uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno, em que a primeira região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 005 (ou seja, SEQ ID NOs 8 e 12) e em que a segunda região de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico compreende as sequências VH e VL do anticorpo 37.3 (ou seja, SEQ ID NOs 46 e 50).

[00147] Em ainda outras modalidades da presente invenção, as sequências VH e VL divulgadas acima podem variar dentro de 90% da identidade da sequência.

[00148] Em ainda uma modalidade diferente, a presente invenção fornece uma molécula de ligação a CD37 compreendendo uma região de ligação a antígeno aqui descrita, em que as sequências CDR são as sequências CDR de um dos anticorpos 004, 005, 010, 016, 28,1 ou 37,3. Em uma modalidade, tal molécula possui apenas uma região de ligação ao antígeno. Por este meio, a molécula de ligação possui ligação monovalente para CD37. De preferência, essa molécula compreende uma região Fc intacta de uma

imunoglobulina. Em uma modalidade, a molécula de ligação a CD37 compreende uma segunda região de ligação ao antígeno para um alvo irrelevante que, por exemplo, pode ser b12.

Mutações que aumentam Fc-Fc

[00149] Em uma modalidade da invenção, uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc do anticorpo biespecífico são substituições de aminoácidos. Pode-se dizer que a região Fc do anticorpo biespecífico compreende duas regiões Fc diferentes, uma de cada anticorpo anti-CD37 parental. Alternativamente, o anticorpo biespecífico pode compreender uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc em cada meia molécula. Deve ser entendido que as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são simétricas, ou seja, mutações idênticas são feitas nas duas regiões Fc.

[00150] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico em que as uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc são substituições de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 na IgG1 humana quando usando o sistema de numeração da UE. Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico em que as uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc são substituições de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 na IgG1 humana quando usando o sistema de numeração da UE, desde que a substituição em 440 seja 440Y ou 440W.

[00151] Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo biespecífico compreendendo pelo menos uma substituição nas referidas primeira e segunda regiões Fc selecionadas do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida particular, o anticorpo biespecífico

compreende pelo menos uma substituição nas referidas primeira e segunda regiões Fc selecionadas de E430G ou E345K, de um modo preferido E430G. Por este meio, são fornecidos anticorpos biespecíficos que terão uma interação Fc-Fc melhorada entre diferentes anticorpos com a referida mutação. Acredita-se que esta mutação faça com que os anticorpos formem oligômeros na célula alvo e, assim, melhorem o CDC.

[00152] Em outra modalidade, o anticorpo biespecífico contém outra mutação nas referidas regiões Fc cuja mutação é selecionada de K439E, S440K e S440R. Um anticorpo biespecífico com uma mutação adicional de K439E e um segundo anticorpo diferente ou anticorpo biespecífico com uma mutação S440K ou S440R adicional formarão oligômeros em padrões alternados do primeiro e do segundo anticorpos. Pensa-se que isso ocorre porque as mutações adicionais causarão uma preferência pela interação entre o primeiro e o segundo anticorpo, em vez da interação entre o primeiro e o primeiro ou o segundo e o segundo anticorpos, devido à ligação não covalente entre as referidas regiões Fc.

[00153] É preferido que as mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc sejam substituições idênticas nas referidas primeira e segunda regiões Fc. Por conseguinte, em uma modalidade preferida, os anticorpos biespecíficos têm a mesma mutação que melhora a interação Fc-Fc em ambas as regiões Fc. A região Fc também pode ser descrita como cadeias Fc, de modo que um anticorpo tenha duas cadeias Fc que compõem uma região Fc comum do anticorpo. Por conseguinte, em uma modalidade preferida, as duas cadeias Fc compreendem uma substituição de uma posição selecionada do grupo de posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 na IgG1 humana quando se utiliza o sistema de numeração da UE. Em uma modalidade, as duas cadeias Fc compreendem cada uma, uma substituição E430G, de modo que um anticorpo biespecífico da invenção compreenda duas substituições E430G. Em outra modalidade, as

duas cadeias Fc compreendem cada uma, uma substituição E345K de modo que o anticorpo biespecífico da invenção compreenda duas substituições E345K.

[00154] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG1.

[00155] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG2.

[00156] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG3.

[00157] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG4.

[00158] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG.

[00159] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é uma combinação dos isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Por exemplo, o primeiro meio anticorpo obtido a partir do primeiro anticorpo parental pode ser um isotipo IgG1 e o segundo meio anticorpo obtido a partir do segundo anticorpo parental pode ser um isotipo IgG4, de modo que o anticorpo biespecífico seja uma combinação de IgG1 e IgG4. Em outra modalidade, é uma combinação de IgG1 e IgG2. Em outra modalidade, é uma combinação de IgG1 e IgG3. Em outra modalidade, é uma combinação de IgG2 e IgG3. Em outra modalidade, é uma combinação de IgG2 e IgG4. Em outra modalidade, é uma combinação de IgG3 e IgG4. Tipicamente, a dobradiça central será uma dobradiça central do tipo IgG1 com a sequência CPPC, mas poderão ser outras dobradiças estáveis e não permitirem a troca de braço Fab *in vivo*, o que é o caso da dobradiça central IgG4 com a sequência CPSC.

[00160] Em uma modalidade preferida, o anticorpo biespecífico da invenção é um anticorpo completo.

[00161] Em ainda outra modalidade da invenção, o anticorpo

biespecífico é um anticorpo humano. Em ainda outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um anticorpo humanizado. Em ainda outra modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é um anticorpo quimérico. Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico é uma combinação de humano, humanizado e quimérico. Por exemplo, a primeira metade do anticorpo obtido a partir do primeiro anticorpo parental pode ser um anticorpo humano e a segunda metade do anticorpo obtido a partir do segundo anticorpo parental pode ser um anticorpo humanizado, de modo que o anticorpo biespecífico seja uma combinação de humano e humanizado. Em uma modalidade preferida da invenção, o anticorpo biespecífico liga ambos o CD37 humano e do macaco cinomolgo, tendo as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs 62 e 63, respectivamente. Esta é uma vantagem, pois permitirá que estudos de toxicologia pré-clínica sejam realizados no macaco cinomolgo com a mesma molécula biespecífica que será posteriormente testada em seres humanos. Nos casos em que os anticorpos contra um alvo humano também não se ligam ao alvo em um modelo animal, é muito difícil realizar estudos de toxicologia pré-clínica e perfil de segurança não clínico das moléculas, o que é um requisito das autoridades reguladoras.

Formatos de anticorpos biespecíficos

[00162] A presente invenção fornece anticorpos CD37xCD37 biespecíficos que promovem eficientemente a morte mediada por CDC e/ou ADCC de células tumorais que expressam CD37, tal como, por exemplo, tumores derivados de células B. Dependendo das propriedades funcionais desejadas para uma utilização particular, regiões de ligação a antígeno específicas podem ser selecionadas a partir do conjunto de anticorpos ou regiões de ligação a antígeno fornecidas pela presente invenção. Muitos formatos e usos diferentes de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica e foram revisados por Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul; 20 (7): 838 a 847 e; MAbs, 2012 mar-abr; 4 (2): 182 a 197.

[00163] Um anticorpo biespecífico de acordo com a presente invenção não está limitado a qualquer formato ou método biespecífico específico de produção, no entanto, um anticorpo biespecífico da invenção deve ter um domínio Fc intacto para induzir interações Fc-Fc melhoradas.

[00164] Exemplos de moléculas de anticorpo biespecíficas que podem ser utilizadas na presente invenção compreendem (i) um único anticorpo que possui dois braços compreendendo diferentes regiões de ligação ao antígeno; (ii) um anticorpo de domínio variável duplo (DVD-Ig) em que cada cadeia leve e cadeia pesada contém dois domínios variáveis em conjunto por meio de uma ligação peptídica curta (Wu *et al.*, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iii) uma molécula chamada “*dock and lock*”, baseada no “domínio de dimerização e ancoragem” na proteína quinase A.

[00165] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico da presente invenção é um anticorpo de corpo cruzado ou biespecífico obtido por meio de uma troca controlada de braço Fab (como descrito em WO 2011131746 (Genmab)).

[00166] Exemplos de classes diferentes de anticorpos biespecíficos incluem, mas não estão limitados a (i) moléculas do tipo IgG com domínios CH3 complementares para forçar a heterodimerização; (ii) moléculas de direcionamento duplo do tipo IgG recombinante, em que os dois lados da molécula contêm cada um o fragmento Fab ou parte do fragmento Fab de pelo menos dois anticorpos diferentes; (iii) moléculas de fusão IgG, em que anticorpos IgG completos são fundidos com fragmento Fab extra ou partes do fragmento Fab; (iv) moléculas de fusão Fc, em que moléculas de Fv de cadeia única ou diacorpos estabilizados são fundidos a domínios constantes de cadeia pesada, regiões Fc ou partes delas; (v) moléculas de fusão Fab, em que diferentes fragmentos Fab são fundidos juntos, fundidos a domínios

constantes de cadeia pesada, regiões Fc ou partes dos mesmos; e (vi) anticorpos de cadeia pesada e baseados em scFv e diacorpo (por exemplo, anticorpos de domínio, nanocorpos) em que diferentes moléculas de Fv de cadeia única ou diferentes diacorpos ou diferentes anticorpos de cadeia pesada (por exemplo, anticorpos de domínio, nanocorpos) são fundidos a um Fc-.

[00167] Exemplos de moléculas do tipo IgG com moléculas de domínio CH3 complementares incluem, entre outras, as moléculas Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO 2011069104), as chamadas moléculas Knobs-in-Holes (Genentech, WO 9850431), CrossMAbs (Roche, WO 2011117329) e as moléculas eletrostaticamente dirigidas (Amgen, EP 1870459 e WO 2009089004; Chugai, US 201000155133; Oncomed, WO 2010129304), as moléculas LUZ-Y (Genentech, Wranik et al., J. Biol. Chem. 2012, 287 (52): 43331 a 43339, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 1 de novembro de 2012), moléculas do corpo DIG e do corpo PIG (Pharmabcine, WO 2010134666, WO 2014081202), as moléculas do corpo do domínio projetado por troca de cadeia (corpo SEEDbody) (EMD Serono, WO 2007110205), as moléculas Biclomics (Merus, WO 2013157953), moléculas Fc Δ Adp (Regeneron, WO 201015792), moléculas de IgG1 e IgG2 biespecíficas modificadas por engenharia de dobradiça (Pfizer/Rinat, WO 11143545), moléculas de andaimes azimétricos (Zymeworks/Merck, WO 2012058768) Moléculas de mAb-Fv (Xencor, WO 2011028952), anticorpos biespecíficos bivalentes (WO 2009080254) e as moléculas DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011131746).

[00168] Exemplos de moléculas de direcionamento duplo do tipo IgG recombinante incluem, mas não estão limitados a, moléculas de Alvo Duplo (DT) -Ig (WO 2009058383), Anticorpo Dois em Um (Genentech; Bostrom, *et al* 2009. Science 323, 1610 a 1614), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO 2008003116), moléculas de Zybody (Zyngenia; LaFleur *et al.* MAbs. 2013 Mar-Abr; 5 (2): 208 a 218), abordagens com

cadeia leve comum (Crucell/Merus, US 7.262.028), κλBodies (NovImmune, WO 2012023053) e corpo CovX (CovX/Pfizer; Doppalapudi, VR, *et al.* 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17.501 a 506).

[00169] Exemplos de moléculas de fusão IgG incluem, entre outras, moléculas de domínio variável duplo (DVD) (Ig) (Abbott, US 7.612.181), anticorpos de cabeça dupla de domínio duplo (Unilever; Sanofi Aventis, WO 20100226923), moléculas biespecíficas do tipo IgG (ILCMone/Eli Lilly, Lewis *et al.* Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32 (2): 191 a 198), Ts2Ab (MedImmune/AZ; Dimasi *et al.* J Mol Biol. 30 de outubro de 2009; 393 (3): 672 a 692) e Moléculas BsAb (Zymogenetics, WO 2010111625), moléculas HERCULES (Biogen Idec, US 007951918), moléculas de fusão scFv (Novartis), moléculas de fusão scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) e moléculas TvAb (Roche, WO 2012025525, WO 2012025530).

[00170] Exemplos de moléculas de fusão Fc incluem, entre outras, fusões ScFv/Fc (Pearce *et al.*, Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42 (6): 1179 a 1188), moléculas SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, *et al.* 100ª reunião anual da AACR 2009 (Resumo # 5465); Zymogenetics/BMS, WO 2010111625), moléculas da tecnologia Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics, WO 2008157379, WO 2010080538) e moléculas duplas (ScFv) 2-Fab (Centro de Pesquisa National em Medicina de Anticorpos - China).

[00171] Exemplos de anticorpos biespecíficos de fusão Fab incluem, mas não estão limitados a, moléculas F(ab)₂ (Medarex/AMGEN; Deo *et al.* J. Immunol. 15 de fevereiro de 1998; 160 (4): 1677 a 1686.), Moléculas de Ação dupla ou Bis-Fab (Genentech, Bostrom, *et al.* 2009. Science 323, 1610 a 1614.), Moléculas Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics, WO 2003074569, WO 2005004809), Moléculas biespecíficas bivalentes (Biotechnol, Schoonjans, J. Immunol. 15 de dezembro de 2000; 165 (12): 7050 a 7057) e moléculas Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

[00172] Exemplos de anticorpos baseados em scFv, diacorpo e domínio incluem: moléculas DART (Dual Affinity Retargeting Technology) (MacroGenics, WO 2008157379, WO 2010080538), moléculas COMBODY (Epigen Biotech, Zhu *et al.*, Immunol Cell Biol. 2010 Aug; 88 (6): 667 a 675) e nanocorpos de alvo duplo (Ablynx, Hmila *et al.*, FASEB J. 2010).

[00173] Em um aspecto, o anticorpo biespecífico da invenção compreende uma primeira região Fc compreendendo uma primeira região CH3 e uma segunda região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que as sequências da primeira e da segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das referidas primeira e segunda regiões CH3. Mais detalhes sobre essas interações e como elas podem ser alcançadas são fornecidas nos documentos WO 2011131746 e WO 2013060867 (Genmab), que são aqui incorporados por referência.

[00174] Como descrito ainda neste documento, um anticorpo CD37xCD37 biespecífico estável pode ser obtido com alto rendimento usando um método particular com base em um anticorpo CD37 inicial homodimérico e outro anticorpo CD37 inicial homodimérico contendo apenas algumas mutações assimétricas bastante conservadoras nas regiões CH3. Mutações assimétricas significam que as sequências das referidas primeira e segunda regiões CH3 contêm substituições de aminoácidos em posições não idênticas, de modo que a primeira e a segunda regiões CH3 têm sequências de aminoácidos diferentes.

[00175] Em um aspecto, o anticorpo biespecífico conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende primeira e segunda regiões Fc, em que cada uma das referidas primeira e segunda regiões Fc compreende pelo menos uma região de dobradiça, uma região CH2 e CH3, em que na referida primeira região Fc, pelo menos um dos

aminoácidos nas posições correspondentes às posições selecionadas no grupo que consiste em T366, L368, K370, D399, F405, Y407 e K409 em uma cadeia pesada de IgG1 humana foi substituído e, na referida segunda região Fc, pelo menos um dos aminoácidos nas posições correspondentes a uma posição selecionada do grupo que consiste em T366, L368, K370, D399, F405, Y407 e K409 em uma cadeia pesada de IgG1 humana foi substituído e em que as referidas primeira e segunda regiões Fc não são substituídas nas mesmas posições.

[00176] Por conseguinte, em uma modalidade preferida da invenção, a primeira região Fc do anticorpo biespecífico compreende uma mutação do aminoácido correspondente à posição F405 na IgG1 humana e a segunda região Fc do anticorpo biespecífico compreende uma mutação adicional do aminoácido correspondente a posição K409 na IgG1 humana. Por conseguinte, estas mutações são assimétricas comparadas com as mutações que melhoram a interação Fc-Fc acima mencionadas.

[00177] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 366, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 368, 370, 399, 405, 407 e 409. Em uma modalidade, o aminoácido na posição 366 é selecionado dentre Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val ou Gln.

[00178] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 368, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 370, 399, 405, 407 e 409.

[00179] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a

primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 370, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 399, 405, 407 e 409.

[00180] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 399 e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 405, 407 e 409.

[00181] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 405, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 407 e 409.

[00182] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 407, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 409.

[00183] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 409, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 407.

[00184] Por conseguinte, em uma modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, as sequências das referidas primeira e segunda regiões Fc contêm mutações assimétricas, ou seja, mutações em posições diferentes nas duas regiões Fc, por exemplo, uma mutação na posição 405 em uma das regiões Fc e uma mutação na posição 409 na outra região Fc.

[00185] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 407. Em uma dessas modalidades, a referida primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Phe, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys ou Leu, na posição 405. Em outra modalidade a seguir, a referida primeira região Fc possui um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Phe, Arg ou Gly, por exemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 405.

[00186] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um aminoácido diferente de Phe, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met ou Cys, na posição 405 e Lys na posição 409. Em uma modalidade adicional deste documento, a referida primeira região Fc compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn,

Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um aminoácido diferente de Phe, Arg ou Gly, por exemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 405 e Lys na posição 409.

[00187] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409. Em uma modalidade adicional deste documento, a referida primeira região Fc compreende um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um aminoácido diferente de Phe, Arg ou Gly, por exemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 405 e Lys na posição 409. Em outra modalidade, a referida primeira região Fc compreende Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00188] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405. Em uma modalidade adicional, a referida primeira região Fc compreende um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00189] Em uma modalidade ainda mais adicional do anticorpo

biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409, um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00190] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00191] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00192] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc compreende um Lys na posição 409 e: a) um Ile na posição 350 e um Leu na posição 405, ou b) um Thr na posição 370 e um Leu na posição 405.

[00193] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc compreende um Thr na posição 350, um Lys na posição 370, um Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e a referida

segunda região Fc compreende um Ile na posição 350, um Thr na posição 370, um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00194] Em uma modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Phe na posição 405, tal como diferente de Phe, Arg ou Gly na posição 405; ou a referida primeira região CH3 possui um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e a referida segunda região CH3 possui um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407.

[00195] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende uma primeira região Fc com um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e uma segunda região Fc com um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407.

[00196] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende uma primeira região Fc com um Tyr na posição 407 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e uma segunda região Fc com um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00197] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende uma primeira região Fc com um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e uma segunda região Fc com um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00198] Em outra modalidade, a referida primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile,

Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr, por exemplo, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp ou Cys, na posição 407. Em outra modalidade, a referida primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a segunda região Fc tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407.

[00199] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407.

[00200] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr, por exemplo, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp ou Cys, na posição 407 e Lys na posição 409.

[00201] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a segunda região Fc tem um Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00202] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00203] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc tem um aminoácido diferente de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser ou Thr, por exemplo, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp ou Cys, na posição 407 e Lys na posição 409.

[00204] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc tem uma Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00205] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a referida primeira região Fc tem um Tyr na posição 407 e um Arg na posição 409 e a referida segunda região Fc tem uma Gly, Leu, Met, Asn ou Trp na posição 407 e um Lys na posição 409.

[00206] Em outra modalidade do anticorpo biespecífico, tal como definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, a primeira região Fc tem um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met, por exemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 409, e a segunda região Fc tem

(i) um aminoácido diferente de Phe, Leu e Met, por exemplo,

Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr ou Cys, na posição 368, ou

(ii) um Trp na posição 370, ou

(iii) um aminoácido diferente de Asp, Cys, Pro, Glu ou Gln, por exemplo, Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr ou Cys, na posição 399, ou

(iv) um aminoácido diferente de Lys, Arg, Ser, Thr ou Trp, por exemplo, Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr ou Cys, na posição 366.

[00207] Em uma modalidade, a primeira região Fc tem um Arg, Ala, His ou Gly na posição 409, e a segunda região Fc tem

(i) um Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Trp na posição 370, ou

(iii) um Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg ou Tyr na posição 399, ou

(iv) um Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met ou Tyr na posição 366.

[00208] Em uma modalidade, a primeira região Fc tem um Arg na posição 409 e a segunda região Fc tem

(i) um Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val ou Trp na posição 368, ou

(ii) um Trp na posição 370, ou

(iii) um Phe, His, Lys, Arg ou Tyr na posição 399, ou

(iv) um Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln na posição 366.

[00209] Além das substituições de aminoácidos especificadas acima, as referidas primeira e segunda regiões Fc podem conter outras substituições, deleção ou inserções de aminoácidos em relação às sequências Fc do tipo selvagem.

[00210] Em uma modalidade preferida da invenção, a segunda região Fc do anticorpo biespecífico compreende uma mutação correspondente a F405 na IgG1 humana e a primeira região Fc compreende uma mutação correspondente a K409 na IgG1 humana quando se utiliza a numeração da UE.

[00211] Em uma modalidade, as mutações na posição F405 e K409 são substituições. Em uma modalidade particular, a substituição na posição F405 é uma substituição de F405L. Em outra modalidade, a substituição na posição K409 é uma substituição K409R.

[00212] Nas modalidades em que o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG4, a primeira região Fc pode compreender ainda uma substituição F405L e uma substituição R409K. Em tais modalidades, a segunda região Fc não é substituída em nenhuma das posições de aminoácidos 405 e 409.

[00213] Deve se entender que, salvo indicação expressa em contrário, todas as mutações de aminoácidos mencionadas nas posições divulgadas são mutações relativas a uma IgG1 humana e utilizam IgG1 humana para numeração utilizando o sistema de numeração da UE.

[00214] Em uma modalidade, nem a referida primeira, nem a referida segunda regiões Fc compreendem uma sequência Cys-Pro-Ser-Cys na região de dobradiça do núcleo.

[00215] Em uma modalidade adicional, tanto a primeira como a segunda regiões Fc mencionadas compreendem uma sequência Cys-Pro-Pro-Cys na região central de dobradiça.

[00216] Por este meio são fornecidos anticorpos biespecíficos que podem ser produzidos com altos rendimentos e que são estáveis *in vivo*.

[00217] Em outra modalidade, o anticorpo biespecífico da invenção aumentou as funções efetoras de CDC e/ou ADCC em comparação com um anticorpo biespecífico idêntico que não possui as mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em outra modalidade, o anticorpo biespecífico da invenção

aumentou as funções efetoras de CDC e/ou ADCC em comparação com um anticorpo parental monoclonal com uma região de ligação da primeira ou da segunda região de ligação do anticorpo biespecífico e com mutações melhoradoras de Fc-Fc idênticas às do anticorpo biespecífico da invenção.

Método de preparação de anticorpos biespecíficos da invenção

[00218] Métodos tradicionais, tais como métodos de conjugação química e hibridoma híbrido (Marvin e Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26: 649) podem ser utilizados na preparação dos anticorpos biespecíficos da invenção. A co-expressão em uma célula hospedeira de dois anticorpos, que consiste em diferentes cadeias pesadas e leves, leva a uma mistura de possíveis produtos de anticorpos além do anticorpo biespecífico desejado, que pode então ser isolado por, por exemplo, cromatografia de afinidade ou métodos semelhantes.

[00219] Estratégias que favorecem a formação de um produto biespecífico funcional, mediante a co-expressão de diferentes construtos de anticorpos, também podem ser utilizadas, por exemplo, o método descrito por Lindhofer *et al.* (1995 J Immunol 155: 219). A fusão de hibridomas de rato e camundongo produzindo anticorpos diferentes leva a um número limitado de proteínas heterodiméricas devido ao emparelhamento de cadeia pesada/leve restrito a espécies preferenciais. Outra estratégia para promover a formação de heterodímeros sobre os homodímeros é uma estratégia de “botão no buraco” na qual uma protuberância é introduzida em um primeiro polipeptídeo de cadeia pesada e uma cavidade correspondente em um segundo polipeptídeo de cadeia pesada, de modo que a protuberância possa ser posicionada na cavidade na interface dessas duas cadeias pesadas, de modo a promover a formação de heterodímero e impedir a formação de homodímero. As “protuberâncias” são construídas substituindo pequenas cadeias laterais de aminoácidos da interface do primeiro polipeptídeo por cadeias laterais maiores. “Cavidades” compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante às

protuberâncias são criadas na interface do segundo polipeptídeo, substituindo grandes cadeias laterais de aminoácidos por cadeias menores (patente US 5.731.168). Os documentos EP 1870459 (Chugai) e WO 2009089004 (Amgen) descrevem outras estratégias para favorecer a formação de heterodímeros mediante a co-expressão de diferentes domínios de anticorpos em uma célula hospedeira. Nestes métodos, um ou mais resíduos que compõem a interface CH3-CH3 em ambos os domínios CH3 são substituídos por um aminoácido carregado, de modo que a formação do homodímero seja eletrostaticamente desfavorável e a heterodimerização seja eletrostaticamente favorável. O documento WO 2007110205 (Merck) descreve ainda outra estratégia, em que as diferenças entre os domínios CH3 de IgA e IgG são exploradas para promover a heterodimerização.

[00220] Outro método *in vitro* para a produção de anticorpos biespecíficos foi descrito no documento WO 2008119353 (Genmab), em que um anticorpo biespecífico é formado pela troca de “braço Fab” ou “meia molécula” (troca de uma cadeia pesada e cadeia leve anexada) entre dois anticorpos monoespecíficos IgG4 ou semelhantes a IgG4 após incubação sob condições redutoras. O produto resultante é um anticorpo biespecífico com dois braços Fab que podem compreender sequências diferentes.

[00221] Um método preferido para a preparação dos anticorpos biespecíficos CD37xCD37 da presente invenção inclui os métodos descritos em WO 2011131746 e WO 2013060867 (Genmab) compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecer um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc, a referida região Fc compreendendo uma primeira região CH3;

b) fornecer um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc, a referida região Fc compreendendo uma segunda região CH3, em que o primeiro anticorpo é um anticorpo CD37 e o segundo anticorpo é um anticorpo CD37 diferente;

em que as sequências das referidas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das referidas primeira e segunda regiões CH3;

c) incubar o referido primeiro anticorpo em conjunto com o referido segundo anticorpo em condições redutoras; e

d) obter o referido anticorpo biespecífico.

[00222] Em uma modalidade, o referido primeiro anticorpo juntamente com o referido segundo anticorpo é incubado sob condições de redução suficientes para permitir que as cisteínas na região de dobradiça sofram isomerização da ligação dissulfeto, em que a interação heterodimérica entre os referidos primeiro e segundo anticorpos no anticorpo heterodimérico resultante é tal que nenhuma troca de braço Fab ocorre a 0,5 mM de GSH após 24 horas a 37 °C.

[00223] Sem se limitar à teoria, na etapa (c), as ligações dissulfeto de cadeia pesada nas regiões de dobradiça dos anticorpos parentais são reduzidas e as cisteínas resultantes são então capazes de formar ligação dissulfeto de cadeia pesada com resíduos de cisteína de outra molécula de anticorpo parental (originalmente com uma especificidade diferente). Em uma modalidade deste método, as condições de redução na etapa (c) compreendem a adição de um agente redutor, por exemplo, um agente redutor selecionado do grupo que consiste em: 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutathione, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína e beta-mercapto-etanol, de um modo preferido um agente redutor selecionado do grupo que consiste em: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol e tris(2-carboxietil)fosfina. Em uma modalidade adicional, a etapa (c) compreende restaurar as condições para se tornarem não redutoras ou redutoras, por exemplo, pela remoção de um agente redutor, por exemplo, dessalinizando.

[00224] Para este método, qualquer um dos anticorpos CD37 aqui

descritos pode ser utilizado, incluindo o primeiro e o segundo anticorpos CD37, compreendendo uma primeira e/ou segunda regiões Fc. Exemplos dessas primeira e segunda regiões Fc, incluindo a combinação dessas primeira e segunda regiões Fc, podem incluir qualquer uma das aqui descritas.

[00225] Em uma modalidade deste método, os referidos primeiro e/ou segundo anticorpos são anticorpos completos.

[00226] As regiões Fc do primeiro e do segundo anticorpos podem ser de qualquer isotipo, incluindo, mas não se limitando a, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade deste método, as regiões Fc dos referidos primeiro e segundo anticorpos são do isotipo IgG1. Em outra modalidade, uma das regiões Fc dos referidos anticorpos é do isotipo IgG1 e a outra do isotipo IgG4. Na última modalidade, o anticorpo biespecífico resultante compreende uma região Fc de uma IgG1 e uma região Fc de IgG4 e, portanto, pode ter propriedades intermediárias interessantes em relação à ativação de funções efectoras.

[00227] Em outra modalidade, uma das proteínas de partida do anticorpo foi manipulada para não se ligar à proteína A, permitindo assim separar a proteína heterodimérica da referida proteína de partida homodimérica passando o produto sobre uma coluna de proteína A.

[00228] Como descrito acima, as sequências da primeira e segunda regiões CH3 dos anticorpos iniciais homodiméricos (anticorpos parentais) são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas da referida primeira e segundas regiões CH3. Mais detalhes sobre essas interações e como elas podem ser alcançadas são fornecidos nos documentos WO 2011131746 e WO 2013060867 (Genmab), que são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

[00229] Em particular, um anticorpo CD37xCD37 biespecífico estável pode ser obtido com alto rendimento usando o método acima da invenção

com base em dois anticorpos iniciais homodiméricos que se ligam a diferentes epítomos de CD37 e contêm apenas algumas mutações assimétricas bastante conservadoras nas regiões CH3. Mutações assimétricas significam que as sequências das referidas primeira e segunda regiões CH3 contêm substituições de aminoácidos em posições não idênticas.

[00230] Os anticorpos biespecíficos da invenção também podem ser obtidos por co-expressão de construtos que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeos em uma única célula. Assim, em um aspecto adicional, a invenção se refere a um método para a produção de um anticorpo biespecífico, o referido método compreendendo as seguintes etapas:

a) fornecer um primeiro construto de ácido nucleico que codifica um primeiro polipeptídeo compreendendo uma primeira região Fc e uma primeira região de ligação ao antígeno de uma primeira cadeia pesada de anticorpo, a referida primeira região Fc compreendendo uma primeira região CH3,

b) fornecer um segundo construto de ácido nucleico que codifica um segundo polipeptídeo compreendendo uma segunda região Fc e uma segunda região de ligação ao antígeno de uma segunda cadeia pesada de anticorpo, a referida segunda região Fc compreendendo uma segunda região CH3,

em que as sequências das referidas primeira e segunda regiões CH3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões CH3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das referidas primeira e segunda regiões CH3,

opcionalmente, em que os referidos primeiro e segundo construtos de ácido nucleico codificam sequências de cadeia leve dos referidos primeiro e segundo anticorpos

c) co-expressar os referidos primeiro e segundo construtos de ácido nucleico em uma célula hospedeira, e

d) obter a referida proteína heterodimérica a partir da cultura de células.

[00231] Assim, a presente invenção também se refere a uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica recombinante que produz um anticorpo biespecífico da presente invenção.

[00232] Em uma modalidade da presente invenção, o anticorpo biespecífico é obtido por qualquer um dos métodos de acordo com a presente invenção.

[00233] Os vetores de expressão adequados, incluindo promotores, melhoradores, etc., e células hospedeiras adequadas para a produção de anticorpos são bem conhecidos na técnica. Exemplos de células hospedeiras incluem células de levedura, bactérias e mamíferos, tal como células CHO ou HEK.

[00234] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que nem a referida primeira, nem a segunda região Fc compreendem uma sequência Cys-Pro-Ser-Cys na região da dobradiça.

[00235] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que as referidas primeira e a segunda regiões Fc compreendem uma sequência Cys-Pro-Pro-Cys na região da dobradiça.

[00236] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que a primeira e a segunda regiões Fc são regiões Fc do anticorpo humano.

[00237] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento,

compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno compreendem sequências VH do anticorpo humano e, opcionalmente, sequências VL do anticorpo humano.

[00238] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno são de anticorpos da cadeia pesada.

[00239] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico, conforme definido em qualquer uma das modalidades divulgadas neste documento, compreende uma primeira região Fc e uma segunda região Fc, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno compreendem uma primeira e uma segunda cadeia leve.

[00240] Em outras modalidades, o método de co-expressão de acordo com a invenção compreende qualquer uma das características adicionais descritas no método *in vitro* acima.

Anticorpos parentais

[00241] Em outra modalidade, a invenção se refere aos anticorpos parentais que são utilizados para preparar os anticorpos biespecíficos da invenção.

[00242] Assim, em uma modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 que se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano que um anticorpo anti-CD37 cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID

NO: 21 [010]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

[00243] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 que compete pela ligação com um anticorpo anti-CD37, compreendendo:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

[00244] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37, compreendendo:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID

NO: 21 **[010]**; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 **[005]**.

[00245] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 compreendendo:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27 e sequência CDR2: YAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28; **[016]** ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6 e sequência CDR2: EAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 **[004]**.

[00246] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo como definido acima, que compreende uma ou mais mutações de aminoácidos na região Fc do anticorpo cuja(s) mutação(ões) melhora(m) a interação Fc-Fc entre os anticorpos após a ligação ao alvo em comparação com a interação Fc-Fc entre anticorpos que não possuem a(s) referida(s) mutação(ões).

[00247] Acredita-se que a referida interação Fc-Fc melhorada tem o efeito de que os anticorpos formam oligômeros, tal como, por exemplo,

hexâmeros nas células alvo cuja formação de oligômeros causa o efeito de CDC melhorada. Em uma modalidade preferida, a uma ou mais mutações de aminoácidos na região Fc do anticorpo são substituições de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 na IgG1 humana ao usar o sistema de numeração da UE e em que a substituição é relativa à sequência de aminoácidos da IgG1 humana. Em uma modalidade, a uma ou mais mutações de aminoácidos na região Fc do anticorpo é uma substituição de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 345 e 440 na IgG1 humana ao usar o sistema de numeração da UE, com a condição de que a substituição em 440 é 440Y ou 440W. Em uma modalidade, pelo menos uma substituição de aminoácidos na região Fc é selecionada do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

[00248] Em uma modalidade preferida, pelo menos uma substituição na referida região Fc é selecionada a partir de E430G ou E345K, de um modo preferido E430G. Estas mutações que melhoram a interação Fc-Fc são mutações simétricas, de modo que as duas cadeias Fc do anticorpo têm mutações/substituições idênticas.

[00249] Em outra modalidade, o anticorpo pode ainda compreender uma substituição em uma posição correspondente a 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409 na IgG1 humana. Um anticorpo tendo uma substituição em uma dessas posições de aminoácidos é um anticorpo estável; no entanto, ele pode, sob condições de redução na reação de “troca de braço fab”, formar anticorpos biespecíficos com um anticorpo tendo uma substituição em outra dessas posições de aminoácidos e tendo uma região de ligação a antígeno diferente. Sob condições de redução suficientes para permitir que as cisteínas na região de dobradiça sofram isomerização da ligação dissulfeto, um anticorpo da invenção formará meias moléculas cada uma compreendendo um único local de ligação ao antígeno e uma região Fc. As substituições em

posições não idênticas em qualquer uma das posições correspondentes a 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409 na IgG1 humana farão com que as meias moléculas do primeiro anticorpo favoreçam a dimerização com as meias moléculas do segundo anticorpo para que anticorpos biespecíficos (heterodiméricos) se formem quando as condições redutoras forem removidas e as ligações dissulfeto na região de dobradiça forem reconfirmadas.

[00250] Assim, dois anticorpos da presente invenção tendo diferentes regiões de ligação ao antígeno e diferentes epítomos no CD37 e contendo uma substituição nas duas cadeias Fc (regiões Fc) em qualquer uma das posições de aminoácidos correspondentes a 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409 na IgG1 humana, mas em posições não idênticas, pode ser adequado para a preparação de um anticorpo biespecífico da invenção.

[00251] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 366 e a referida segunda proteína homodimérica possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 368, 370, 399, 405, 407 e 409. Em uma modalidade, o aminoácido na posição 366 é selecionado dentre Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, Glu e Gly.

[00252] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 368 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 370, 399, 405, 407 e 409.

[00253] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 370 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 399, 405, 407 e 409.

[00254] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 399 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do

grupo que consiste em: 366, 368, 370, 405, 407 e 409.

[00255] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 405 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 407 e 409.

[00256] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 407 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 409.

[00257] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui uma substituição de aminoácidos na posição 409, e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 407.

[00258] Em uma modalidade, o primeiro anticorpo possui um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409, tal como um aminoácido selecionado do grupo que compreende: Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Phe ou Tyr na posição 409 e o referido segundo anticorpo possui uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 407.

[00259] Em uma dessas modalidades, o referido primeiro anticorpo possui um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409, tal como um aminoácido selecionado do grupo que compreende: Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Phe ou Tyr na posição 409 e o referido segundo anticorpo possui um aminoácido diferente de Phe na posição 405, tal como um aminoácido selecionado do grupo que compreende: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Met ou Tyr na posição correspondente a 405 em IgG1. Em uma modalidade adicional deste documento, o referido primeiro anticorpo possui um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e o referido segundo anticorpo

possui um aminoácido diferente de Phe, Arg ou Gly na posição 405.

[00260] Em outra modalidade, o referido primeiro anticorpo compreende um Phe na posição 405 e um aminoácido diferente de Lys, Leu ou Met na posição 409 e o referido segundo anticorpo compreende um aminoácido diferente de Phe na posição 405 e um Lys na posição 409.

[00261] Em outra modalidade, o referido primeiro anticorpo compreende Phe na posição 405 e um Arg na posição 409 e o referido segundo anticorpo compreende um Leu na posição 405 e um Lys na posição 409. Nas modalidades em que os anticorpos são dos isotipos IgG1, IgG2 ou IgG3, o primeiro o anticorpo pode compreender uma substituição de F405L e o segundo anticorpo pode compreender uma substituição de K409R ou vice-versa. No entanto, nas modalidades em que os anticorpos são ambos os isotipos de IgG4, o aminoácido na posição 409 é naturalmente um Arg (R). Assim, em tais modalidades, o primeiro anticorpo não é substituído na posição 409, mas naturalmente possui um R409 e o segundo anticorpo compreende substituições de F405L e R405K, ou vice-versa; o segundo anticorpo não é substituído na posição 409, mas naturalmente possui um R409 e o primeiro anticorpo compreende substituições F405L e R405K. Em modalidades em que um ou ambos os primeiro e segundo anticorpos são do isótipo IgG4

[00262] Por conseguinte, em uma modalidade, o anticorpo da invenção pode compreender uma substituição correspondente a F405L na IgG1 humana. Em outra modalidade, um anticorpo da invenção pode compreender uma substituição correspondente a K409R na IgG1 humana. Esses dois anticorpos diferentes são adequados para a preparação de um anticorpo biespecífico da invenção. Em uma modalidade particularmente preferida, um primeiro anticorpo da invenção compreende uma substituição F405L e uma E430G e um segundo anticorpo da invenção compreende uma substituição K409R e uma E430G. Por este meio são fornecidos anticorpos que podem

formar anticorpos biespecíficos da invenção, cujos anticorpos biespecíficos compreendem uma primeira meia molécula compreendendo substituições F405L + E430G e uma segunda meia molécula compreendendo K409R + E430G quando se utiliza IgG1 para numeração. Nas modalidades em que o isotipo é IgG4, a primeira meia molécula compreende substituições F405L + R409K + E430G e a segunda meia molécula compreende um E430G ao usar IgG4 para numeração. De preferência, nessas modalidades de IgG4, a região de dobradiça do núcleo é substituída de uma sequência de aminoácidos 'CPSC' por uma sequência de 'CPPC' para tornar o anticorpo biespecífico mais estável *in vivo* e/ou *in vitro* em comparação com um anticorpo IgG4 com a dobradiça do núcleo CPSC .

[00263] Em uma modalidade da invenção, o primeiro anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e uma sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00264] Em outra modalidade da invenção, o primeiro anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID

NO: 20 e uma sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00265] Em outra modalidade da invenção, o primeiro anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e uma sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00266] Em ainda outra modalidade da invenção, o primeiro anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e uma sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade

preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00267] Em uma modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27 e uma sequência CDR2: YAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00268] Em outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27 e uma sequência CDR2: YAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F,

E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00269] Em outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6 e uma sequência CDR2: EAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 [004]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00270] Em ainda outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6 e uma sequência CDR2: EAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 [004]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00271] Em outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1

estabelecida na SEQ ID NO: 40, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44 e uma sequência CDR2: FAK e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00272] Em ainda outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44 e uma sequência CDR2: FAK e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00273] Em outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID

NO: 51 e uma sequência CDR2: VAT e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 [37.3]; e uma região Fc compreendendo uma substituição F405L e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00274] Em ainda outra modalidade da invenção, o segundo anticorpo compreende uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49, e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51 e uma sequência CDR2: VAT e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 [37.3]; e uma região Fc compreendendo uma substituição K409R e em ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc. Em uma modalidade preferencial, as mutações que melhoram a interação Fc-Fc são substituições em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas do grupo que compreende: 430, 345 e 440, tal como E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, é E430G.

[00275] Por conseguinte, a invenção também se refere a um anticorpo anti-CD37 que se liga ao CD37 humano cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44 e sequência CDR2: FAK e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1] ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51 e sequência CDR2: VAT e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 **[37.3]**;

(iii) e em que o anticorpo de (i) ou (ii) compreende uma região Fc compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W; e

(iv) em que opcionalmente a região Fc compreende adicionalmente uma mutação de K409R ou F405L.

[00276] Como mencionado acima, os anticorpos anti-CD37 da invenção podem ser um isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD37 da invenção é de um isotipo IgG.

[00277] Em uma modalidade, o anticorpo da invenção é humano, humanizado ou quimérico.

[00278] Em uma modalidade, o anticorpo da invenção se liga aos antígenos CD37 humano e dos cinomolgos.

Modalidades adicionais da invenção

[00279] Em outra modalidade, a invenção se refere a uma composição compreendendo um anticorpo biespecífico da invenção e compreendendo adicionalmente um anticorpo monoespecífico anti-CD37, de um modo preferido um anticorpo anti-CD37 com a região de ligação ao antígeno da primeira ou segunda regiões de ligação ao antígeno do anticorpo biespecífico.

[00280] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo biespecífico da invenção ou um anticorpo anti-CD37 da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00281] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo

biespecífico da invenção ou a um anticorpo da invenção ou a uma composição da invenção para uso como medicamento.

[00282] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo biespecífico da invenção é para uso no tratamento de câncer, doença autoimune ou distúrbios inflamatórios.

[00283] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD37 da invenção é para uso no tratamento de câncer, doença autoimune ou distúrbios inflamatórios.

[00284] Em uma modalidade da invenção, a composição da invenção é para uso no tratamento de câncer, doença autoimune ou distúrbios inflamatórios.

[00285] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo biespecífico da invenção para uso no tratamento de alergias, rejeição de transplantes ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA).

[00286] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo biespecífico da invenção para uso no tratamento de artrite reumatoide, tal como artrite aguda, artrite reumatoide crônica, artrite tipo gota ou gotosa, artrite gotosa aguda, artrite imunológica aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite induzida por colágeno tipo II, artrite infecciosa, artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, doença de Still, artrite vertebral e artrite reumatoide de início juvenil, osteoartrite, artrite crônica progrediente, artrite deformante, poliartrite crônica primária, artrite reativa, espondilite anquilosante) lúpus eritematoso sistêmico (LES), tal como LES cutâneo ou LES cutâneo subagudo, síndrome do lúpus neonatal (SLN) e disseminação do lúpus eritematoso, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal (DII) que inclui colite ulcerosa e doença de Crohn, doença pulmonar

obstrutiva crônica (DPOC), psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia grave, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud e glomerulonefrite, pustulose palmoplantar (PPP), líquen plano erosivo, pênfigo bolhoso, epidermólise bolhosa, dermatite de contato e dermatite atópica, polirradiculite incluindo Guillain-Barre.

[00287] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 da invenção para uso no tratamento de alergia, rejeição de transplante ou malignidade de células B.

[00288] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 da invenção para uso no tratamento de alergias, rejeição de transplantes ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA).

[00289] Em outra modalidade, a invenção se refere a um anticorpo anti-CD37 da invenção para uso no tratamento de artrite reumatoide, tal como artrite aguda, artrite reumatoide crônica, artrite por gota ou gotosa, artrite gotosa aguda, artrite imunológica aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite induzida por colágeno tipo II, artrite infecciosa, artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, doença de Still, artrite vertebral e artrite reumatoide de início juvenil, osteoartrite, artrite crônica progrediente, artrite deformante, poliartrite crônica primária, artrite reativa, espondilite anquilosante, lúpus eritematoso sistêmico (LES), tal como LES cutâneo ou LES cutâneo subagudo, síndrome do lúpus neonatal (SLN) e disseminação de lúpus eritematose, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal (DII) que inclui colite ulcerativa e doença de Crohn, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia grave, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud e glomerulonefrite, pustulose palmoplantar (PPP), líquen plano erosivo, pênfigo bolhoso,

epidermólise bolhosa, dermatite de contato e dermatite atópica, polirradiculite incluindo Guillain-Barre.

[00290] Em outra modalidade, a invenção se refere ao anticorpo biespecífico da invenção para uso em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em outra modalidade da invenção, os anticorpos anti-CD37 da invenção são para uso em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. O um ou mais agentes terapêuticos adicionais podem, por exemplo, ser selecionado a partir do grupo que compreende: doxorrubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, vincristina, fludarabina, ibrutinibe e um anticorpo anti-CD 20, tal como rituximabe, ofatumumabe, obinutuzumabe, Veltuzumabe, Ocaratuzumabe, Ocrelizumabe ou TRU-015.

[00291] Em uma modalidade preferida da invenção, o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-CD20.

[00292] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar ao CD20 humano tendo as sequências estabelecidas na SEQ ID No: 72.

[00293] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar ao CD20 de macaco cinomolgo possuindo as sequências estabelecidas na SEQ ID No: 73.

[00294] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar ao CD20 humano e de macaco cinomolgo, tendo as sequências estabelecidas nas SEQ ID Nos 72 e 73, respectivamente.

[00295] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar a um epítipo no CD20 humano, que não compreende ou requer os resíduos de aminoácidos alanina na posição 170 ou prolina na posição 172, mas que compreende ou requer o resíduos de aminoácido asparagina na posição 163 e asparagina na posição 166 da SEQ ID No. 72. Exemplos de tais anticorpos são os anticorpos identificados como 2F2 e 7D8

como divulgados em WO 2004035607 (Genmab) e o anticorpo identificado como 2C6 como divulgado em WO 2005103081 (Genmab). As sequências CDR de 7D8 são divulgadas na Tabela 1.

[00296] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar a um epítopo no CD20 humano, que não compreende ou requer os resíduos de aminoácidos alanina na posição 170 ou prolina na posição 172 da SEQ ID NO: 72. Um exemplo de tal anticorpo é 11B8 como divulgado em WO 2004035607 (Genmab). As sequências CDR de 11B8 são divulgadas na Tabela 1.

[00297] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar a um epítopo descontínuo no CD20 humano, em que o epítopo compreende parte do primeiro pequeno laço extracelular e parte do segundo laço extracelular.

[00298] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 é capaz de se ligar a um epítopo descontínuo no CD20 humano, em que o epítopo tem resíduos AGIYAP do primeiro laço extracelular pequeno e resíduos MESLNFIRAHTPY do segundo laço extracelular.

[00299] Os anticorpos anti-CD20 podem se caracterizar como anticorpos anti-CD20 do tipo I e II. Os anticorpos anti-CD20 do tipo I têm alta atividade de CDC e ADCC, mas baixa atividade de apoptose, tal como ofatumumab (2F2) e rituximabe, enquanto os anticorpos de tipo II anti-CD20, com baixa ou nenhuma atividade CDC, mas alta atividade de ADCC e apoptose. Além disso, os anticorpos do tipo I induzem o CD20 a se redistribuir em grandes microdomínios resistentes a detergentes (balsas), enquanto os anticorpos do tipo II não.

[00300] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, em que a região de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD20 humano com um anticorpo anti-CD20 compreendendo a sequência de

cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 78, respectivamente.

[00301] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, em que a região de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD20 humano com um anticorpo anti-CD20 compreendendo a sequência de cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 81 e SEQ ID NO: 109, respectivamente.

[00302] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, em que a região de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD20 humano com um anticorpo anti-CD20 compreendendo a sequência de cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 98, respectivamente.

[00303] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, em que a região de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD20 humano com um anticorpo anti-CD20 compreendendo a sequência de cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 87 e SEQ ID NO: 91, respectivamente.

[00304] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, em que a região de ligação ao antígeno compete pela ligação ao CD20 humano com um anticorpo anti-CD20 compreendendo a sequência de cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 101 e SEQ ID NO: 105, respectivamente.

[00305] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 75,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 76,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 77,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 79
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 80. **[7D8]**

[00306] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 82,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 83,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 84,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 85
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 86. **[118B]**

[00307] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 95,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 96,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 97,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 99,
 sequência VL CDR2: ATS, e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 100.

[Rituximabe]

[00308] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 88,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 89,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 90,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 92
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 93.

[ofatumumab]

[00309] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 102,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 103,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 104,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 106
 sequência VL CDR2: QMS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 107.

[obinutuzumabe]

[00310] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD20 compreende uma região de ligação ao antígeno capaz de se ligar ao CD20 humano, compreendendo as sequências CDR selecionadas do grupo que consiste em:

- i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 75,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 76,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 77,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 79
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 80 [7D8];
- ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 82,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 83,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 84,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 85
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 86 **[118B]**;
 iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 95,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 96,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 97,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 99,
 sequência VL CDR2: ATS, e
 sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 100

[Rituximabe];

iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 88,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 89,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 90,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 92
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 93

[ofatumumab]; e

v) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 102,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 103,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 104,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 106
 sequência VL CDR2: QMS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 107

[obinutuzumabe].

[00311] Em outra modalidade, a invenção se refere ao uso do anticorpo biespecífico da invenção ou do anticorpo anti-CD37 da invenção para a fabricação de um medicamento. Em outra modalidade deste documento, o uso é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, doenças autoimunes ou doenças inflamatórias, tal como alergia, rejeição de transplante

ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), linfocítica crônica leucemia (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA), artrite reumatoide, tal como artrite aguda, artrite reumatoide crônica, artrite por gota ou gotosa, artrite gotosa aguda, artrite imunológica aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite induzida por colágeno tipo II, artrite infecciosa, artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, doença de Still, artrite vertebral e artrite reumatoide de início juvenil, osteoartrite, artrite crônica progrediente, artrite deformantes, poliartrite crônica primária, artrite reativa e espondilite anquilosante, lúpus eritematoso sistêmico (LES), tal como LES cutâneo ou LES cutâneo subagudo, síndrome do lúpus neonatal (SLN) e disseminação do lúpus eritematoso, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal (DII) que inclui colite ulcerosa e doença de Crohn, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), psoríase, nefropatia por IgA, polineuropatias por IgM, miastenia grave, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud e glomerulonefrite, pustulose palmoplantar (PPP), líquen plano erosivo, pênfigo bolhoso, epidermólise bolhosa, dermatite de contato e dermatite atópica, polirradiculite incluindo Síndrome de Guillain-Barre.

[00312] Em outra modalidade, a invenção se refere a um método para induzir a morte celular, ou inibir o crescimento e/ou proliferação de uma célula tumoral que expressa CD37, compreendendo administrar a um indivíduo com necessidade do(a) mesmo(a) uma quantidade eficaz de um anticorpo biespecífico da invenção ou um anticorpo anti-CD37 da invenção. Em certas modalidades, o método é para tratar um indivíduo com alergia, rejeição de transplante ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica

aguda (LLA), compreendendo administrar ao referido indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo biespecífico da invenção ou do anticorpo anti-CD37 da invenção. Em certas modalidades, o método compreende administrar um ou mais agentes terapêuticos adicionais em combinação com o referido anticorpo ou o referido anticorpo biespecífico, tal como por exemplo doxorrubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, vincristina, fludarabina, ibrutinibe ou um anticorpo anti-CD20, tal como rituximabe, ofatumumabe, obinutuzumabe, veltuzumabe, ocaratuzumabe, ocrelizumabe, TRU-015.

[00313] Em uma modalidade da invenção, o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que compreende: ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, ifosfamida, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, carmustina, prednisona, dexametasona, fludarabina, pentostatina, cladribina, fluorouracil, gencitabina, citarabina, metotrexato, pralatrexato, gencitabina, vincristina, paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina, mitoxantrona, etoposide, topotecano, irinotecano, bleomicina, rituximabe específico para CD20, obinutuzumabe e ofatumumabe, alemtuzumabe específico para CD52, brentuximabe específico para CD30, JNJ-63709178, JNJ-64007957, HuMax-IL8, anti-DR5, anti-VEGF, anti-CD38, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-CD40, anti-CD137, anti-GITR, anti-VISTA, anticorpos específicos para outros alvos imunomoduladores, brentuximabe vedotina, HuMax-TAC-ADC, interferon, talidomida, lenalidomida, Axicabtagene ciloleucel, bortezomibe, romidepsina, belinostat, vorinostat, ibrutinibe, acalabrutinibe, idelalisibe, copanlisibe, sorafenibe, sunitinibe, everolímus, TRAIL humano recombinante, birinapante e venetoclax.

[00314] Em uma modalidade da invenção, o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que compreende: ibrutinibe, rituximabe, venetoclax, CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona), bendamustina, fludarabina, ciclofosfamida e clorambucil.

[00315] Em uma modalidade da invenção, o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que compreende: ibrutinibe, rituximabe e venetoclax.

[00316] Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um construto de ácido nucleico que codifica uma ou mais sequências estabelecidas na Tabela 1. Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um construto de ácido nucleico que codifica uma ou mais sequências selecionadas do grupo que compreende as SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13a, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20a, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27a, 28, 29, 30, 30a e 31.

[00317] A invenção se refere ainda a um construto de ácido nucleico que codifica a região VH e/ou VL do anticorpo biespecífico ou do anticorpo anti-CD37 de qualquer uma das modalidades deste documento.

[00318] A invenção ainda se refere a um construto de ácido nucleico que codifica o anticorpo biespecífico ou o anticorpo anti-CD37 de qualquer uma das modalidades deste documento.

[00319] Em outra modalidade, a invenção se refere a um vetor de expressão compreendendo um ou mais construtos de ácido nucleico especificados acima. Em outra modalidade, a invenção se refere a uma célula hospedeira que compreende um vetor de expressão como definido acima.

[00320] Um vetor de expressão no contexto da presente invenção pode ser qualquer vetor adequado, incluindo vetores de ácidos nucleicos cromossômicos, não cromossômicos e sintéticos (uma sequência de ácidos nucleicos que compreende um conjunto adequado de elementos de controle de expressão). Exemplos de tais vetores incluem derivados de SV40, plasmídeos bacterianos, DNA de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNA de fago e vetores de ácido nucleico viral (RNA ou DNA). Em uma modalidade, um ácido nucleico que codifica o anticorpo CD37 é compreendido em um vetor de DNA ou RNA nu,

incluindo, por exemplo, um elemento de expressão linear (como descrito, por exemplo, em Sykes e Johnston, *Nat Biotech* 17, 355 a 359 (1997)), um vetor de ácido nucleico compactado (como descrito, por exemplo, em US 6.077.835 e/ou WO 00/70087), um vetor de plasmídeo como pBR322, pUC 19/18 ou pUC 118/119, um vetor de ácido nucleico de “cume” de tamanho mínimo (como descrito em por exemplo Schakowski *et al.*, *Mol Ther* 3, 793 a 800 (2001)), ou como um construto precipitado de vetor de ácido nucleico, tal como um construto precipitado por CaPO₄ (como descrito em, por exemplo, WO 200046147, Benvenisty e Reshef, *PNAS US* 83, 9551 55 (1986), Wigler *et al.*, *Cell* 14, 725 (1978), e Coraro e Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Tais vetores de ácidos nucleicos e a sua utilização são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, US 5.589.466 e US 5.973.972).

[00321] Em uma modalidade, o vetor é adequado para a expressão dos anticorpos CD37 em uma célula bacteriana. Exemplos de tais vetores incluem vetores de expressão como BlueScript (Stratagene), vetores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol Chem* 264, 5503 a 5509 (1989), vetores pET (Novagen, Madison WI) e similares.

[00322] Um vetor de expressão pode também ou alternativamente ser um vetor adequado para expressão em um sistema de levedura. Qualquer vetor adequado para expressão em um sistema de levedura pode ser empregado. Os vetores adequados incluem, por exemplo, vetores compreendendo promotores constitutivos ou induzíveis, tal como fator alfa, álcool oxidase e PGH (revisado em: F. Ausubel *et al.*, Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing e Wiley InterScience New York (1987) e Grant *et al.*, *Methods in Enzymol* 153, 516 a 544 (1987)).

[00323] Um vetor de expressão pode também ou alternativamente ser um vetor adequado para expressão em células de mamífero, por exemplo, um vetor que compreende glutamina sintetase como marcador selecionável, tal como os vetores descritos em Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 169

a 175.

[00324] Um ácido nucleico e/ou vetor também pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de secreção/localização, que pode direcionar um polipeptídeo, tal como uma cadeia polipeptídica nascente, para o espaço periplásmico ou para o meio de cultura celular. Tais sequências são conhecidas na técnica e incluem peptídeos líderes ou de sinal de secreção.

[00325] O vetor de expressão pode compreender ou estar associado a qualquer promotor, intensificador e outros elementos facilitadores da expressão. Exemplos de tais elementos incluem promotores de expressão fortes (por exemplo, promotor/intensificador de CMV IE humano, bem como promotores de RSV, SV40, SL3 3, MMTV e HIV LTR), sequências eficazes de terminação de poli (A), uma origem de replicação para o produto plasmídeo em *E. coli*, um gene de resistência a antibióticos como marcador selecionável e/ou um sítio de clonagem conveniente (por exemplo, um poliligante). Os ácidos nucleicos também podem compreender um promotor indutível em oposição a um promotor constitutivo, tal como CMV IE.

[00326] Em uma modalidade, o vetor de expressão que codifica o anticorpo CD37 pode ser posicionado e/ou entregue à célula hospedeira ou animal hospedeiro através de um vetor viral.

[00327] Assim, a presente invenção também se refere a uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica recombinante que produz um anticorpo biespecífico da presente invenção, tal como um transfectoma.

[00328] A invenção se refere ainda a um anticorpo anti-idiotípico, que se liga à região de ligação ao antígeno do anticorpo ou ao anticorpo biespecífico da invenção.

[00329] Um método *in vitro* para detectar a presença de um antígeno CD37 humano ou uma célula que expressa CD37 humano em uma amostra, o referido método compreendendo:

(i) contatar a amostra com o anticorpo biespecífico de qualquer uma das modalidades acima ou com o anticorpo de qualquer uma das modalidades aqui descritas sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou o anticorpo biespecífico e CD37; e

(ii) detectar a formação de um complexo.

[00330] Um método *in vivo* para detectar a presença de um antígeno CD37 humano ou uma célula que expressa CD37 humano em um indivíduo, o referido método compreendendo:

(i) administrar o anticorpo biespecífico de qualquer uma das modalidades acima ou o anticorpo de qualquer uma das modalidades aqui descritas sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou o anticorpo biespecífico e CD37; e

(ii) detectar o complexo formado.

Sequências

Tabela 1

SEQ ID NO:	RÓTULO	SEQUÊNCIA
1	VH-004-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWV RQAPGKGGLEWVSIYSSVGAYYASWAKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYGASSSDYIFSLWG QGTLVTVSS
2	VH-004-H5L2-CDR1	GFSLSYD
3	VH-004-H5L2-CDR2	IYSSVGA
4	VH-004-H5L2-CDR3	AREYGASSSDYIFSL
5	VL-004-H5L2	AQVLTQSPSPLASVSGDRVTITCQASQSVYNSQNLAW YQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFKSGSGTEFTL TISSLQPDFFATYYCQGEFSCISADCTAFGGGTKVEIK
6	VH-004-H5L2-CDR1	QSVYNSQN
	VH-004-H5L2-CDR2	EAS
7	VH-004-H5L2-CDR3	QGEFSCISADCTA
8	VH-005-H1L2	EQSVVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSNAMNWV RQAPGKGGLEWIGLIYASGNTDYASWAKGRFTISKSTT VYLKITSPTAEDTATYFCAREGSVWGAAAFDPWGQGT LTVSS
9	VH-005-H1L2-CDR1	GFSLSSNA
10	VH-005-H1L2-CDR2	IYASGNT
11	VH-005-H1L2-CDR3	AREGSVWGAAAFDP
12	VL-005-H1L2	AYDMTQSPSSVSASVSGDRVTITCQASQSSISNWLAWYQ QKPGKAPKQLIYAASLASGVPSRFKSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGYSNSNIDNTFGGGGTKVEIK
13	VL-005-H1L2-CDR1	QSSISNW
	VL-005-H1L2-CDR2	AAS
14	VL-005-H1L2-CDR3	QQGYSNSNIDNT

15	VH-010-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYNAMNWV RQAPGKGLEWVSIIFASGRTDYASWAKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSTWGDALDPWG QGTLVTVSS
16	VH-010-H5L2-CDR1	GFSLSYNA
17	VH-010-H5L2-CDR2	IFASGRT
18	VH-010-H5L2-CDR3	AREGSTWGDALDP
19	VL-010-H5L2	AYDMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQNIIDYLAWYQQ KPGKAPKLLIHKASTLASGVPSRFRKSGSGSGTEFTLTIS LQPDDFATYYCQQGYSNSNIDNTFGGGTKVEIK
20	VL-010-H5L2-CDR1	QNIIDY
	VL-010-H5L2-CDR2	KAS
21	VL-010-H5L2-CDR3	QQGYSNSNIDNT
22	VH-016-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNYNMGWV RQAPGKGLEWVSVIDASGTTYATWAKGRFTISRDNK KNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARELLYFGSSYYDLW GQGLTVTVSS
23	VH-016-H5L2-CDR1	GFSLSNYN
24	VH-016-H5L2-CDR2	IDASGTT
25	VH-016-H5L2-CDR3	ARELLYFGSSYYDL
26	VL-016-H5L2	DVVMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQNIDSNLAWYQ QKPGKAPKFLIYYASNLPGVPSRFRKSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQCADVGSTYVAAFGGGKVEIK
27	VL-016-H5L2-CDR1	QNIDSN
	VL-016-H5L2-CDR2	YAS
28	VL-016-H5L2-CDR3	QCADVGSTYVAA
29	VL-016-H5L2-C90S	DVVMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQNIDSNLAWYQ QKPGKAPKFLIYYASNLPGVPSRFRKSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYCQ S ADVVGSTYVAAFGGGKVEIK
30	VL-016-H5L2-C90S- CDR1	QNIDSN
	VL-016-H5L2-C90S- CDR2	YAS
31	VL-016-H5L2-C90S- CDR3	Q S ADVVGSTYVAA
32	VH-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWV RQAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFAD TSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQ DNYMDVWGKGTTVIVSS
33	VH-b12-CDR1	GYRFSNFV
34	VH-b12-CDR2	INPYNGNK
35	VH-b12-CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYMDV
36	VL-b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHISRRVAVWYQH KPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
37	VL-b12-CDR1	HSIRSR
	VL-b12-CDR2	GVS
38	VL-b12-CDR3	QVYGASSYT
39	VH-G28.1	AVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYNMNWV KQNGKSLEWIGNIDPYYGGTTYNRKFKGKATLTVDK SSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARSVGPMDYWGQGT SVTVSS
40	VH-G28.1-CDR1	GYSFTGYN
41	VH-G28.1-CDR2	IDPYYGGT
42	VH-G28.1-CDR3	ARSVGPMDY
43	VL-G28.1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENVYSYLAWYQQ KQGKSPQLLVSAKTLAEGVPSRFRSGSGSGTQFSLKISS LQPEDSGSYFCQHSDNPWTFGGGTELEIK
44	VL-G28.1-CDR1	ENVYSY
	VL-G28.1-CDR2	FAK

45	VL-G28.1-CDR3	QHHSNPWT
46	VH-37.3	QVQVKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTSGVSWVR QPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSALKSRLSIKKDHSK SQVFLKLNSLQTDATYCAKGGYSLAHWGQGLV TVSA
47	VH-37.3-CDR1	GFSLTSG
48	VH-37.3-CDR2	IWGDGST
49	VH-37.3-CDR3	AKGGYSLAH
50	VL-37.3	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQ KQKGSPQLLVNATNLADGVPSRFGSGSGTQYSLKIN SLQSEDFGTYYCQHYWGTTWTFGGGKLEIK
51	VL-37.3-CDR1	ENIRSN
	VL-37.3-CDR2	VAT
52	VL-37.3-CDR3	QHYWGTTWT
53	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	IgG1-Fc-delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG.
55	IgG1-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHGCALHNHYTQKSLSLSPGK
56	IgG1-E345R-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	IgG1-F405L-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

58	IgG1-K409R-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	IgG1-F405L-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHGAALHNHYTQKSLSLSPGK
60	IgG1-K409R-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHGAALHNHYTQKSLSLSPGK
61	Kappa-C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLLCNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLT KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	CD37 humano	MSAQESCLSLIKYFLFVFNLFFFVLGSLIFCFGIWILDK TSFVSFVGLAFVPLQIWSKVLAIISGIFTMGIALLGCVGA LKELRLLCGLYFGMLLLLFATQITLGILISTQRAQLERS LRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCG WHYPQDWFQVLILRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDST ILDKVILPQLSRLGHLARSRHSAICAVPAESHIYREGC AQGLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCR NLDHVYNRLARYR
63	CD37 cinomolgo (mfCD37)	MSAQESCLSLIKYFLFVFNLFFFVLGSLIFCFGIWILDK TSFVSFVGLAFVPLQIWSKVLAIISGVFTMGIALLGCVG ALKELRLLCGLYFGMLLLLFATQITLGILISTQRAQLER SLQDIVEKTIQKYHTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCG WHSPQDWFQVLTIRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDST ILDKVILPQLSRLGQLARSRHSTDICAVPANSHIYREGC ARSLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCRN LDHVYNRLARYR
64	CD37EC2-FcHis	MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWARAQLERSLRDVE KTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQD WFQVLILRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVIL PQLSRLGHLARSRHSAICAVPAESHIYREGCAQGLQK WLHNNPKSCDKTHTCPPCPAPEAGAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHH

65	CD37MfEC2-FcHis	MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWARAQLERSLQDIVEK TIQKYHTNPEETA AEESWDYVQFQLRCCGWHSPQDW FQVLTLRGNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVILP QLSRLGQLARSRHSTDICAVPANSIIYREGCARSLQKW LHNNPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPPV LDSGDSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHH
66	IgG1-F405L-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
67	IgG1-F405L-E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRKPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	IgG1-F405L-E430S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHSALHNHYTQKSLSLSPGK
69	IgG1-K409R-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
70	IgG1- K409R -E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PRKPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

71	IgG1- K409R -E430S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHSALHNHYTQKSLSLSPGK
72	CD20 humano	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLV GPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGI YAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLAATEKNSRKCLVK GKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNF IRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILS VMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEE KKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEET ETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
73	CD20 de macaco cinomolgo	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLRRMSSLV VGPTQSFFMRESKALGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGI YAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLAATEKNSRKCLV KGMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLN FIRVHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGIL SVMLIFAFFQELVIAGIVENEWRRRTCSRPKSSVLLSAE EKKEQVIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEET TETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
74	VH CD20-7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAAS <u>GFTFHDYAMHW</u> VRQAPGKGLEWVST <u>ISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDN</u> NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDIQYGNYYYYG</u> <u>MDVWGQGTTVTVSS</u>
75	VH CD20-7D8 CDR1	GFTFHDYA
76	VH CD20-7D8 CDR2	ISWNSGTI
77	VH CD20-7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYYGMDV
78	VL CD20-7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSYLAWYQQ</u> KPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYC <u>QQRSNWPITFGQGRLEIK</u>
79	VL CD20-7D8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20-7D8 CDR2	DAS
80	VL CD20-7D8 CDR3	QQRSNWPIT
81	VH CD20-11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCTGSG <u>GFTFSYHAMHW</u> VRQAPGKGLEWVSI <u>IGTG</u> GVTYADSVKGRFTISRDN VKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYC <u>ARDYYGAGSFYDG</u> <u>LYGMDVWGQGTTVTVSS</u>
82	VH CD20-11B8 CDR1	GFTFSYHA
83	VH CD20-11B8 CDR2	IGTG
84	VH CD20-11B8 CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGM
85	VL CD20-11B8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20-11B8 CDR2	DAS
86	VL CD20-11B8 CDR3	QQRSDWPLT
87	VH CD20- ofatumumab	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFNDYAMHW</u> VRQAPGKGLEWVST <u>ISWNSGSI</u> GYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDIQYGNYYYYG</u> <u>MDVWGQGTTVTVSS</u>
88	VL CD20-ofatumumab CDR1	GFTFNDYA
89	VH CD20- ofatumumab CDR2	ISWNSGSI
90	VH CD20- ofatumumab CDR3	AKDIQYGNYYYYGMDV

91	VL CD20-ofatumumab	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQ KPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYC <u>QORSNWPIT</u> FGQGTREIK
92	VL CD20-ofatumumab CDR1	QSVSSY
	VL CD20-ofatumumab	DAS
93	VL CD20-ofatumumab CDR3	QQRSNWPIT
94	VH CD20-rituximabe	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS <u>GYTFTSYN</u> MH WVKQTPGRGLEWIGAI <u>IYPGN</u> GDTSYNQKFKGKATLT ADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC <u>ARST</u> <u>YYGGDWYFNV</u> WGAGTTVTVA
95	VH CD20-rituximabe CDR1	GYTFTSYN
96	VH CD20-rituximabe CDR2	IYPGN
97	VH CD20-rituximabe CDR3	ARSTYYGGDWYFNV
98	VL CD20-rituximabe	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASS <u>SSVS</u> YIHWFQQKP GSSPKPWIY <u>ATS</u> NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVE AEDAATYYC <u>QOWTSNPPT</u> FGGGTKLEIK
99	VL CD20-rituximabe CDR1	SSVS
	VL CD20-rituximabe CDR2	ATS
100	VL CD20-rituximabe CDR3	QOWTSNPPT
101	VH CD20- obinutuzumabe	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCCKAS <u>GYAF</u> SYSWINW VRQAPGQGLEWMGR <u>IFPGD</u> GDTDYNGKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARNVFDGYWLVY</u> WGQGT
102	VH CD20- obinutuzumabe CDR1	GYAFSYSW
103	VH CD20- obinutuzumabe CDR2	IFPGD
104	VH CD20- obinutuzumabe CDR3	ARNVFDGYWLVY
105	VL CD20- obinutuzumabe	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSS <u>KSL</u> LHSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIY <u>QMS</u> NLVSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYC <u>AQNLELPYT</u> FGGGTKVEIK
106	VL CD20- obinutuzumabe CDR1	KSLLSNGITY
	VL CD20- obinutuzumabe CDR2	QMS
107	VL CD20- obinutuzumabe CDR3	AQNLELPYT
108	IgG1- S239D-I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

109	VL CD20 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQORSDWPLTFGGGKVEIK
110	VH CD37-004	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYDMSWVRQ APGKGGLEWIGIYSSVGAYYASWAKGRFTFSKTSTTV LKITSPTTDTATYFCAREYGASSSDYIFSLWGQGLVT VSS
2	VH CD37-004 CDR1	GFSLSYD
3	VH CD37-004 CDR2	IYSSVGA
4	VH CD37-004 CDR3	AREYGASSSDYIFSL
111	VL CD37-004	AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASQSVYNSQNLAW YQQKPGQPPKLLIYEASKLASGVPSRFKSGSGTQFTL TISGVQSDDAATYYCQGEFSCISADCTAFGGGTEVVVK
6	VL CD37-004 CDR1	QSVYNSQN
	VL CD37-004 CDR2	EAS
7	VL CD37-004 CDR3	QGEFSCISADCTA
112	VH CD37-005	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSNAMNWVR QAPGKGGLEWIGLIYASGNTDYASWAKGRFTISKSTTV DLKITSPTTDTATYFCAREGSVWGAAFDPWGPGTLV TVSS
9	VH CD37-005 CDR1	GFSLSNA
10	VH CD37-005 CDR2	IYASGNT
11	VH CD37-005 CDR3	AREGSVWGAAFD
113	VL CD37-005	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSSINWLAWY QQKPGQPPKQLIYAASLASGVPSRFKSGSGTQFTLTI SGVESADAATYYCQQGYSNSNIDNTFGGGTEVVVK
13	VL CD37-005 CDR1	QSSINW
	VL CD37-005 CDR2	AAS
14	VL CD37-005 CDR3	QQGYSNSNIDNT
114	VH CD37-010	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSYNAMNWVR QAPGKGGLEWIGIIFASGRDYASWAKGRFTISKSTTVE LKITSPTTDTATYFCAREGSTWGDALDPWGPGTLVT VSS
16	VH CD37-010 CDR1	GFSLSYNA
17	VH CD37-010 CDR2	IFASGRT
18	VH CD37-010 CDR3	AREGSTWGDALDP
115	VL CD37-010	AYDMTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQNIIDYLAWYQ QKPGQPPQLLIHKASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTIS GVQSDDAATYYCQQGYSNSNIDNTFGGGTEVVVK
20	VL CD37-010 CDR1	QNIIDY
	VL CD37-010 CDR2	KAS
21	VL CD37-010 CDR3	QQGYSNSNIDNT
116	VH CD37-016	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSNYNMGWVR QAPGKGGLEWIGVIDASGTTYATWAKGRFTCSKTSST VELKMTSLTTDTATYFCARELLYFGSSYYDLWGQGT LTVSS
23	VH CD37-016 CDR1	GFSLSNYN
24	VH CD37-016 CDR2	IDASGTT
25	VH CD37-016 CDR3	ARELLYFGSSYYDL
117	VL CD37-016	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQNIDSNLAWYQ QKPGQPPKFLIYYASNLPGVSSRFKSGSGTQFTLTIS DLESADAATYYCQCADVGSTYVAAFGGGTEVVVK
27	VL CD37-016 CDR1	QNIDSN
	VL CD37-016 CDR2	YAS
28	VL CD37-016 CDR3	QCADVGSTYVAA

EXEMPLOS

Exemplo 1: Geração de anticorpos específicos CD37 em coelhos

Construtos de expressão para CD37

[00331] Foram geradas os seguintes construtos otimizados por códon para expressão de variantes de CD37 completas: CD37 humano (*Homo sapiens*) CD37 (número de acesso ao Genbank NP_001765) (SEQ ID NO: 62), CD37 de macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*) ((mfCD37) (SEQ ID NO: 63). Além disso, os seguintes construtos otimizados por códon para expressão de várias variantes de CD37 ECD foram gerados: uma sequência de codificação de peptídeo sinal seguida pelo segundo domínio extracelular (EC2) do CD37 humano (aa 112-241), fundido ao domínio Fc (CH2-CH3) da IgG humana com um marcador His C-terminal (CD37EC2-FcHis, SEQ ID NO: 64) e um construto semelhante para mfCD37 (CD37mfEC2-FcHis, SEQ ID NO: 65). Os construtos continham sítios de restrição adequados para clonagem e uma sequência ótima de Kozak (GCCGCCACC) [Kozak *et al.* (1999) *Gene* 234: 187 a 208]. Os construtos foram clonados no vetor de expressão em mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen) ou vetor equivalente.

Expressão transitória nas células CHO e HEK

[00332] As proteínas de membrana foram transfectadas transitoriamente em células Freestyle 293-F (HEK293F) (Life technologies, EUA) usando 293fectin (Life technologies) essencialmente como descrito pelo fabricante, ou em células Freestyle CHO-S (CHO) (Life technologies) usando o Reagente Freestyle Max (Life technologies) essencialmente como descrito pelo fabricante. As proteínas solúveis foram transitoriamente expressas nas células Expi293 (Life technologies) usando o reagente ExpiFectamine 293 (Life technologies), essencialmente como descrito pelo fabricante.

[00333] As proteínas de fusão Fc (CD37mfEC2-FcHis e CD37EC2-FcHis) foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura de células utilizando cromatografia de afinidade com proteína A.

Imunização de coelhos

[00334] A imunização de coelhos foi realizada na MAB Discovery GMBH (Neuried, Alemanha). Os coelhos foram imunizados repetidamente com uma mistura de células CD37EC2-FcHis e CD37mfEC2-FcHis ou HEK293F que expressam transitoriamente mfCD37 ou humano. O sangue desses animais foi coletado e os linfócitos B foram isolados. Utilizando um processo proprietário da MAB Discovery, células B únicas foram classificadas em poços de placas de microtitulação e propagadas posteriormente. Os sobrenadantes destas células B únicas foram analisados quanto à ligação específica a células CHO-S que expressam transitoriamente CD37 (CHO-CD37) e mfCD37 (CHO-mfCD37).

Produção de anticorpos recombinantes

[00335] Após análise dos resultados primários de triagem, os acertos primários foram selecionados para sequenciamento, produção de mAb recombinante e purificação. As regiões codificadoras únicas da cadeia pesada variável (VH) e da cadeia leve (VL) foram sintetizadas e clonadas em vetores de expressão em mamíferos que contêm as sequências codificadoras da região constante IgG1 humana (cadeia Ig Kappa e alótipo G1m (f) da IgG1 contendo uma mutação E430G (número da UE) corrente pesada). Durante este processo, uma cisteína desfavorável e não emparelhada em algumas cadeias leves de anticorpos foi substituída por uma serina.

[00336] Os anticorpos quiméricos recombinantes foram produzidos em células HEK 293 por cotransfecção transitória dos vetores de expressão que codificam cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC) usando um procedimento automatizado em uma plataforma Tecan Freedom Evo. As imunoglobulinas foram purificadas a partir do sobrenadante celular utilizando purificação por afinidade (Proteína A) em um sistema HPLC Dionex Ultimate 3000.

[00337] A reatividade dos anticorpos monoclonais quiméricos produzidos (VH de coelho, Fc humano) (mAbs) contendo uma mutação E430G foi analisada novamente quanto à ligação a células CHO-CD37 ou

CHO-mfCD37. Além disso, foi analisada a ligação à linhagem celular Daudi de linfoma humano e a funcionalidade no ensaio CDC em células Daudi.

Exemplo 2: Humanização de anticorpos quiméricos de coelho

Geração de sequências de anticorpos humanizados

[00338] Sequências de anticorpos humanizados de anticorpos de coelho anti-CD37-004, -005, -010 e -016 foram geradas em Antitope (Cambridge, Reino Unido). As sequências de anticorpos humanizados foram geradas usando a tecnologia de humanização da linhagem germinativa (enxerto de CDR). Os genes da região V humanizada foram projetados com base nas sequências da linhagem germinativa humana com homologia mais próxima das sequências de aminoácidos VH e Vκ dos anticorpos de coelho e murino. Uma série de quatro a seis genes da região V humanizada da linhagem germinativa VH e quatro ou cinco Vκ (VL) foi projetada para cada um dos anticorpos de coelho.

[00339] Modelos estruturais das regiões V do anticorpo de coelho foram produzidos usando Swiss PDB e analisados para identificar aminoácidos nas estruturas da região V que podem ser importantes para as propriedades de ligação do anticorpo. Estes aminoácidos foram anotados para incorporação em um ou mais anticorpos variantes enxertados em CDR.

[00340] A sequência de aminoácidos da região V das cadeias pesada e leve foi comparada com um banco de dados de sequências dos segmentos V e J da linhagem germinativa humana, a fim de identificar as sequências humanas das cadeias pesada e leve com o maior grau de homologia para uso como estruturas de domínio variável humano. As sequências da linhagem germinativa usadas como base para os projetos humanizados são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências mais próximas do segmento V da linhagem germinativa humana e do segmento J humano.

anti-CD37 de Coelho	Cadeia pesada		Cadeia leve (□)	
	Segment da linhagem germinativa da região V humana	Segment da linhagem germinativa da região J humana	Segment da linhagem germinativa da região V humana	Segment da linhagem germinativa da região J humana
004	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-5*01	IGKJ4
005	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-12*01	IGKJ4
010	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-5*03	IGKJ4
016	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-12*01	IGKJ4

[00341] Uma série de regiões V humanizadas das cadeias pesada e leve foi então projetada enxertando as CDRs nas estruturas e, se necessário, através da mutação reversa de resíduos que podem ser críticos para as propriedades de ligação do anticorpo, conforme identificado na modelagem estrutural, aos resíduos de coelho. Sequências variantes com a menor incidência de possíveis epítopos de células T foram então selecionadas usando as tecnologias proprietárias da Antitope em silico, iTope™ e TCED™ (banco de dados de epítopos de células T) (Perry, LCA, Jones, TD e Baker, MP New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development, 2008. Drugs in R&D 9 (6): 385 a 396; Bryson, CJ, Jones, TD e Baker, MP Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins (2010) .Biodrugs 24 (1): 1 a 8). Finalmente, as sequências nucleotídicas das variantes projetadas foram otimizadas por códon.

[00342] Para o anticorpo IgG1-016-H5L2, uma variante com uma mutação pontual no domínio variável foi gerada para substituir uma cisteína livre: IgG1-016-H5L2-LC90S (também gerada com mutações F405L e E430G adicionais). Este mutante foi gerado por síntese genética (Geneart).

[00343] As sequências de região variável dos anticorpos CD37 humanizados são mostradas na Listagem de Sequências aqui e na Tabela 1 acima.

Exemplo 3: Geração de anticorpos biespecíficos

[00344] Os anticorpos IgG1 biespecíficos foram gerados por troca de braço Fab sob condições de redução controladas. A base para este método é o uso de domínios CH3 complementares, que promovem a formação de

heterodímeros sob condições específicas de ensaio, conforme descrito em WO 2011/131746. As mutações F405L e K409R (numeração da UE) foram introduzidas em anticorpos CD37 para criar pares de anticorpos com domínios CH3 complementares. As mutações F405L e K409R foram em certos casos combinadas com a mutação E430G.

[00345] Para gerar anticorpos biespecíficos, os dois anticorpos complementares parentais, cada anticorpo em uma concentração final de 0,5 mg/mL, foram incubados com 2-mercaptoetilamina-HCl 75 mM (2-MEA), em um volume total de 100 µL TE a 31 °C por 5 horas. A reação de redução foi interrompida removendo o agente redutor 2-MEA usando colunas de rotação (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante.

Exemplo 4: Construtos de expressão para anticorpos, expressão transitória e purificação

[00346] Para a expressão do anticorpo, as sequências VH e VL foram clonadas em vetores de expressão (pcDNA3.3) contendo, no caso do VH, a cadeia pesada constante relevante (HC), em certos casos contendo uma mutação F405L ou K409R e/ou uma mutação E345R ou E430G e, no caso da VL, regiões da cadeia leve (LC).

[00347] Os anticorpos foram expressos como IgG1, k. As misturas de DNA plasmídico que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpos foram transfectadas transitoriamente em células Expi293F (Life technologies, EUA) usando 293fectin (Life technologies) essencialmente como descrito por Vink *et al.* (Vink *et al.*, Methods, 65 (1), 5 a 10 2014). Em seguida, os anticorpos foram purificados por cromatografia em proteína G imobilizada.

[00348] Os seguintes anticorpos foram usados nos exemplos:

Anticorpos IgG1 de tipo selvagem:

[00349] IgG1-004-H5L2 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5)

IgG1-005-H1L2 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 12)

IgG1-010-H5L2 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 19)

IgG1-016-H5L2 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 26)

IgG1-G28.1 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 43 - com base nas SEQ ID NOs 1 e 3 em EP 2241577)

IgG1-G28.1-K409R-delK (também contendo uma mutação na cadeia pesada do terminal C 445-PG-446)

IgG1-37.3 (tendo as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 50 - com base nas SEQ ID NOs 55 e 72 no documento WO 2011/112978)

IgG1-b12 (com as sequências VH e VL estabelecidas nas SEQ ID NO: 32 e SEQ ID NO: 36 - com base no anticorpo específico para gp120 b12 [Barbas, CF. J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230 (3) : 812 a 823])

Anticorpos IgG1 com mutação E430G para melhorar a interação Fc-Fc:

[00350] IgG1-004-H5L2-E430G
 IgG1-005-H1L2-E430G
 IgG1-010-H5L2-E430G
 IgG1-016-H5L2-E430G
 IgG1-G28.1-E430G
 IgG1-37.3-E430G
 IgG1-b12-E430G
 IgG1-005-H1L2-K409R-E430G
 IgG1-010-H5L2-K409R-E430G
 IgG1-016-H5L2-F405L-E430G
 IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G

IgG1-004-E430G

IgG1-005-E430G

IgG1-010-E430G

IgG1-016-E430G

Anticorpos IgG1 com mutação E430S para melhorar a interação Fc-Fc:

[00351] IgG1-010-H5L2-K409R-E430S

IgG1-016-H5L2-F405L-E430S

Anticorpos IgG1 com mutação E345K para melhorar a interação Fc-Fc:

[00352] IgG1-010-H5L2-K409R-E345K

IgG1-016-H5L2-F405L-E345K

Anticorpos IgG1 com mutação E345R para melhorar a interação Fc-Fc:

[00353] IgG1-G28.1-E345R

IgG1-b12-E345R

IgG1-010-H5L2-K409R-E345R

IgG1-016-H5L2-F405L-E345R

Anticorpos biespecíficos

[00354] bsIgG1-016-H5L2-F405LxIgG1-IgG1-005-H1L2-K409R

bsIgG1-016-H5L2-F405LxIgG1-010-H5L2-K409R

Anticorpos biespecíficos com mutação E430G para melhorar a interação Fc-Fc:

[00355] bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G

bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G

Anticorpo IgG1 com a mutação para melhorar a interação FcγR S239D-I332E:

[00356] IgG1-G28.1-S239D-I332E

Exemplo 5: A introdução de uma mutação que melhora a interação Fc-Fc em anticorpos CD37 resulta em capacidade melhorada *de novo* para induzir citotoxicidade dependente do complemento (CDC)

Determinação da citotoxicidade dependente do complemento (CDC)

[00357] Em um primeiro experimento, as células tumorais derivadas de um paciente com LLC não tratado (AllCells, Califórnia, EUA) foram ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2% (albumina de soro bovino) e plaqueadas em placas de poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Greiner bio-one Cat # 650101) a uma densidade de $0,2 \times 10^5$ células/poço (40 µL/poço) e 40 µL de uma série de concentrações de IgG1-G28.1-K409R-delK, IgG1-G28.1-E345R ou IgG1-b12-E345R (Concentração final de anticorpo 0,003 a 10 µg/mL). IgG1-b12-E345R (com base no anticorpo específico gp120 b12 [Barbas, CF. J Mol Biol. 1993, 5 de abril de 1993; 230 (3): 812 a 823]) foi usado como controle negativo. Para IgG1-G28.1-K409R-delK, deve-se notar que a mutação K409R não tem efeito na capacidade de ligação ou na capacidade de induzir CDC. Da mesma forma, a mutação delK (445-PG-446), que foi introduzida no anticorpo para facilitar a análise bioquímica, não afetou a ligação ao alvo ou a capacidade de induzir o CDC (veja abaixo).

[00358] Após a incubação (temperatura ambiente, 10 minutos com agitação), 20 µL de soro humano normal reunido (NHS Cat # M0008 Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram adicionados a cada poço, tal como fonte de complemento e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. A reação foi parada esfriando as placas em gelo. Em seguida, foi adicionado iodeto de propídio (PI; 10 µL de uma solução de 10 µg/mL; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Holanda) e a lise foi detectada pela medição da porcentagem de células mortas (correspondentes às células PI-positivas) por citometria de fluxo (FACS Canto II; BD Biosciences). Os gráficos foram

gerados usando os melhores valores de ajuste não linear da dose-resposta com concentrações transformadas em log no software GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

[00359] Em um segundo experimento, as células tumorais de outro paciente com LLC não tratado (AllCells, Califórnia, EUA) foram ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2%, foram colocadas em placas de poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Greiner bio-one Cat # 650101) em uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço (30 μ L/poço) e 50 μ L de uma série de concentrações de IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G ou IgG1-b12 (concentração final de anticorpo de 0,003 a 10 μ g/mL em diluições em série de 3,33x). Após a incubação (temperatura ambiente, 15 minutos), 20 μ L de soro humano normal reunido (NHS Cat # M0008 Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram adicionados a cada poço como fonte de complemento e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. A reação foi parada esfriando as placas em gelo. Em seguida, foi adicionado iodeto de propídio (PI; 20 μ L de uma solução de 10 μ g/mL; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Holanda) e a lise foi detectada pela medição da porcentagem de células mortas (correspondentes às células PI-positivas) por citometria de fluxo (FACS Canto II; BD Biosciences). Os gráficos foram gerados usando os melhores valores de ajuste não linear da dose-resposta com concentrações transformadas em log no software GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

[00360] As Figuras 1A e B mostram que o anticorpo CD37 G28.1 sem a mutação E345R ou E430G que melhora a interação Fc-Fc (IgG1-G28.1 ou IgG1-G28.1-K409R-delK) não induziu CDC em células tumorais primárias de pacientes com LLC, enquanto G28.1 com a mutação E345R ou E430G (IgG1-G28.1-E345R ou IgG1-G28.1-E430G) induziu CDC profundo e dependente da dose de células LLC primárias.

Determinação quantitativa de antígenos da superfície celular por citometria de

fluxo (Qifi)

[00361] Os níveis de expressão de proteínas reguladoras de CD37 e complemento de membrana (mCRP; CD46, CD55 e CD59) nas células tumorais de LLC foram determinados usando o Kit de Calibrador de IgG Humano (Biocytix Cat # CP010). Resumidamente, células tumorais derivadas de um paciente com LLC (como no primeiro experimento descrito acima), ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2%, foram plaqueadas em placas de poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Greiner bio-one Cat # 650101) a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço (30 µL/poço), centrifugadas e 50 µL de CD37 (Abcam, N° de cat. 76522) ou anticorpo de camundongo de controle (IgG1 de camundongo purificado, Controle de isotipo κ, Clone MOPC-21; BD cat. 555746) foi adicionado. Após a incubação (4 °C, 30 minutos), 50 µL de esferas de calibração foram adicionados em cavidades separadas. Após lavagem das esferas e células duas vezes (150 µL de tampão FACS, centrifugando por 3 minutos a 300xg a 4 °C entre as etapas de lavagem), 50 µL/diluição de anticorpo secundário do poço (conjugado com FITC), conforme fornecido no Human IgG Calibrator Kit, foi adicionado. Após a incubação no escuro (4 °C, 45 minutos), as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e as células foram ressuspensas em 35 µL de tampão FACS e analisadas por citometria de fluxo (rastreador Intellicyt iQue™). A quantidade de antígeno foi determinada calculando a capacidade de ligação ao anticorpo com base na curva de calibração, de acordo com as diretrizes do fabricante.

[00362] A Figura 2 mostra que o CD37 foi altamente expresso em células tumorais primárias deste paciente com LLC. O paciente mostrou níveis normais de expressão de mCRP's.

Exemplo 6: Ligação de anticorpos CD37 e suas variantes à superfície celular que expressa CD37

[00363] A ligação à CD37 expressa na superfície celular (células

Daudi, células CHO que expressando CD37 de cinomolgo) foi determinada por citometria de fluxo. As células, ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2%, foram semeadas a 100.000 células/poço em placas de poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Greiner bio-one Cat # 650101) e centrifugadas por 3 minutos a 300xg, 4 °C. Foram adicionadas diluições em série (concentração final de anticorpo 0,003 a 10 µg/mL em diluições em série de 3,33x) de CD37 ou anticorpos de controle e as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C. As placas foram lavadas/centrifugadas duas vezes usando tampão FACS (PBS/BSA a 0,1%/Na-azida a 0,01%). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com IgG F(ab')₂ anti-cabra conjugada com R-Ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; nº de catálogo: 109-116-098) diluído 1/100 em PBS/BSA a 0,1%/Na-azida a 0,01%. As células foram lavadas/centrifugadas duas vezes usando tampão FACS, ressuspensas em 30 µL de tampão FACS e analisadas através da determinação das intensidades médias de fluorescência usando um rastreador Intellicyt iQue™ (Westburg). As curvas de ligação foram geradas utilizando análises de regressão não linear (resposta-dose sigmoidal com inclinação variável) no software GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, Sand Diego, CA, EUA).

Ligação às células Daudi

[00364] A Figura 3 mostra que os anticorpos CD37 humanizados IgG1-004-H5L2, IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2 e IgG1-016-H5L2 mostraram ligação dependente da dose às células Daudi. A introdução da mutação E430G que melhora a interação Fc-Fc e para IgG1-005-H1L2 também a mutação K409R nesses anticorpos não afetaram a ligação.

[00365] A Figura 4 mostra que a introdução da mutação E430G em IgG1-G28.1 ou IgG1-37.3 não afetou a ligação a células Daudi.

[00366] Para o anticorpo IgG1-016-H5L2, uma variante com uma mutação pontual no domínio variável foi gerada para substituir uma cisteína

livre na cadeia leve: IgG1-016-H5L2-LC90S. Essa variante também foi gerada com mutações F405L e E430G adicionais que anteriormente demonstravam não afetar as características de ligação ao alvo. A Figura 5 mostra que as IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G e IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G mostraram ligação comparável às células Daudi, portanto, a mutação LC90S não afetou a ligação.

Ligação a células CHO que expressam CD37 de macaco cinomolgo

[00367] A ligação a células CHO que expressam CD37 de macaco cinomolgo foi determinada por citometria de fluxo utilizando um método como descrito acima. A Figura 6 mostra que IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G mostraram ligação dependente da dose a células CHO que expressam CD37 de macaco cinomolgo. As IgG1-G28.1 e IgG1-28.1-E430G não se ligaram a células CHO que expressam CD37 de cinomolgo.

Exemplo 7: Identificação de anticorpos CD37 que não competem pela ligação a CD37

(Falta de) competição de ligação - determinada por citometria de fluxo

[00368] Os anticorpos CD37 foram marcados com Alexa Fluor 488 NHS Ester (Succinimidil Éster). 1 mg de anticorpo CD37 (dissolvido em PBS) foi transferido para um frasco de 1 ml de microcentrífuga (frasco de reação). O pH foi aumentado por adição de um volume de 10% de tampão de bicarbonato de sódio 1 M (pH 9). Imediatamente antes do uso, 1 mg de Alexa Fluor 488 NHS Ester (ajustado à temperatura ambiente) foi dissolvido em 100 µL de DMSO. A reação de marcação foi iniciada pela adição de 10 µL da solução de corante Alexa fresca por mg de anticorpo. Os frascos de reação foram tapados e misturados suavemente por inversão. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a reação foi extinta pela adição de 50 µL de Tris 1M a cada frasco de reação. O corante que não reagiu foi removido do

anticorpo marcado com Alexa por filtração em gel usando colunas BioRad PDP10 equilibradas com tampão salino borato, de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos marcados com Alexa foram armazenados a 4 °C e protegidos da luz.

[00369] A competição de ligação entre diferentes anticorpos CD37 foi determinada por citometria de fluxo. As células Raji (ATCC, CCL-86) foram ressuspensas em meio Raji (RPMI 1640, 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES e 1 mM de piruvato) a uma concentração de 1×10^7 células/mL. Em seguida, alíquotas de 30 µL da suspensão de células foram transferidas para tubos FACS juntamente com alíquotas de 30 µL (concentração final de 40 µg/mL) de soluções de anticorpos não marcadas. A mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos enquanto se agitava suavemente. Em seguida, foram preparadas diluições de anticorpos marcados com A488 e após a incubação, 10 µL dos anticorpos marcados (concentração final de 4 µg/mL de anticorpos) foram transferidos para os tubos FACS contendo os anticorpos e células não marcadas. A mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos enquanto agitava suavemente. Após a incubação, as amostras foram extintas pela adição de 4 mL de PBS gelado, centrifugadas por 3 minutos a 4 °C a 2000 rpm, aspiradas duas vezes e ressuspensas em 125 µL de PBS. A competição de ligação foi analisada determinando-se as intensidades médias de fluorescência usando um BD FACSCalibur (BD Biosciences). As intensidades de fluorescência foram convertidas em Moléculas de Fluorocoma Solúvel Equivalente (MESF) para quantificação.

[00370] As Figuras 7A e Figura 8 mostram que a pré-incubação de células Raji com IgG1-005-H1L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G bloqueou a ligação subsequente de IgG1-005-H1L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G, mas não de IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G.

[00371] A pré-incubação de células Raji com IgG1-004-H5L2-E430G reduziu substancialmente a ligação subsequente de IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1 -004-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G, mas não de IgG1-005-H1L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G.

[00372] A pré-incubação das células Raji com IgG1-016-H5L2-E430G bloqueou a ligação subsequente de IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G, mas não de IgG1-005-H1L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G.

[00373] A pré-incubação de células com IgG1-37.3-E430G bloqueou a ligação subsequente de todos os anticorpos testados. No entanto, tal como discutido acima, a pré-incubação com IgG1-005-H1L2-E430G ou IgG1-010-H5L2-E430G não bloqueou a ligação de IgG1-37.3-E430G.

[00374] A pré-incubação das células com IgG1-G28.1-E430G bloqueou a ligação subsequente de IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G, mas não de IgG1-005-H1L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G.

(Falta de) competição obrigatória - determinada pela triagem funcional usando um ensaio CDC

[00375] Para determinar se os anticorpos CD37 não bloqueadores mostram CDC melhorada quando combinados e para confirmar o potencial de combinar funcionalmente anticorpos CD37 não bloqueadores cruzados, foi realizado um ensaio CDC utilizando anticorpos CD37 individuais e combinações dos mesmos.

[00376] As células Raji, ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2%, foram plaqueadas em placas de fundo redondo de 96 poços de poliestireno (Greiner bio-one Cat # 650101) a uma densidade de 1×10^5 células/poço (30 μ L/poço) e 50 μ L de amostras humanizadas. Foram adicionados anticorpos CD37, variantes dos mesmos, combinações dos mesmos ou anticorpo de controle IgG1-b12 (10 μ g/mL de concentração final de anticorpo,

combinações 5 + 5 µg/mL). Após a incubação (temperatura ambiente, 15 minutos, enquanto agitava), 20 µL de soro humano normal reunido (NHS Cat # M0008 Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. As placas foram centrifugadas (3 minutos, 1200 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado iodeto de propídio (PI; 30 µL de uma solução de 1,67 µg/mL; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Holanda) e a lise foi detectada por medição da porcentagem de células mortas (correspondentes a células PI-positivas) por fluxo citometria (Screener Intellicyt iQue™, Westburg). Os dados foram analisados no software GraphPad Prism (software Graphpad, San Diego, CA, EUA).

[00377] As Figuras 7B e C mostram que a combinação de IgG1-004-H5L2 mais IgG1-010-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) e a combinação de IgG1-005-H1L2 mais IgG1-016-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) induziram CDC melhorada em comparação com os seus homólogos individuais. A combinação de IgG1-004-H5L2 mais IgG1-016-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) não induziu CDC melhorada em comparação com os seus homólogos individuais.

[00378] As Figuras 7D e E mostram que a combinação de IgG1-004-H5L2 mais IgG1-005-H1L2 (com ou sem a mutação E430G) e a combinação de IgG1-010-H5L2 mais IgG1-016-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) induziram CDC melhorada comparado com os seus homólogos individuais. A combinação de IgG1-005-H1L2 mais IgG1-010-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) não induziu CDC melhorada em comparação com os seus homólogos individuais.

[00379] As Figuras 7F e G mostram que a combinação de IgG1-37.3 mais IgG1-005-H1L2 (com ou sem a mutação E430G) e a combinação de IgG1-37.3 mais IgG1-010-H5L2 (com ou sem a mutação E430G) induziram CDC melhorada em comparação com seus homólogos individuais.

[00380] Assim, os estudos de combinação funcional confirmaram os resultados dos estudos de competição de ligação para os anticorpos CD37 descritos e mostraram que os anticorpos CD37 não bloqueadores cruzados podem ser funcionalmente combinados.

Exemplo 8: A introdução de uma mutação que melhora a interação Fc-Fc em anticorpos CD37 humanizados resulta em capacidade melhorada *de novo* para induzir citotoxicidade dependente do complemento (CDC)

[00381] As células Daudi, ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2%, foram plaqueadas em placas de fundo redondo de 96 poços de poliestireno (Greiner bio-one Cat # 650101) a uma densidade de 1×10^5 células/poço (30 μ L/poço) e foram adicionados 50 μ L de uma série de concentrações de anticorpos humanizados CD37 e suas variantes, ou anticorpo de controle IgG1-b12 (concentração final de 0,003 a 10 μ g/mL de anticorpo em diluições em série de 3,33x). Após a incubação (temperatura ambiente, 15 minutos), 20 μ L de soro humano normal reunido (NHS, Cat # M0008 Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. As placas foram centrifugadas (3 minutos, 1200 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado iodeto de propídio (PI; 30 μ L de uma solução de 1,67 μ g/mL; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Holanda) e a lise foi detectada por medição da porcentagem de células mortas (correspondentes a células PI-positivas) por fluxo citometria (Screener Intellicyt iQue™, Westburg). Os gráficos foram gerados usando os melhores valores de ajuste não linear de dose-resposta com concentrações transformadas em log no software GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

[00382] A Figura 9 mostra que IgG1-004-H5L2, IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2 e IgG1-016-H5L2 não induziram CDC em células Daudi. Após a introdução da mutação E430G que melhora a interação Fc-Fc, esses anticorpos (IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-

H5L2-E430G e IgG1-016-H5L2-E430G) induziram CDC dependente da dose de células Daudi, profunda.

[00383] A Figura 10A mostra que IgG1-G28.1 e IgG1-37.3 não induziram CDC em células Daudi. Após a introdução da mutação E430G que melhora a interação Fc-Fc, esses anticorpos (IgG1-G28.1-E430G e IgG1-37.3-E430G) induziram CDC profundo e dependente da dose de células Daudi.

[00384] Para o anticorpo IgG1-016-H5L2, uma variante com uma mutação pontual no domínio variável foi gerada para substituir uma cisteína livre na cadeia leve: IgG1-016-H5L2-LC90S. Além disso, esta variante também foi gerada com uma mutação F405L (anteriormente mostrada para não afetar a ligação ao alvo ou CDC) e uma mutação E430G que melhora a interação Fc-Fc. A Figura 11 mostra que os IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G e IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G mostraram atividade comparável em um ensaio CDC *in vitro*, portanto, a mutação LC90S não afetou a capacidade de induzir o CDC. IgG1-016-H5L2 não induziu CDC em células Daudi.

[00385] Além disso, a introdução de outras mutações que melhoram a interação Fc-Fc, E345K, E345R, E430S e RRGY, em IgG1-010-H5L2 e IgG1-016-H5L2 resultou em CDC profunda de células Daudi. As Figuras 10B e C mostram que a lise máxima da célula Daudi era comparável para todas as mutações que melhoram a interação Fc-Fc testadas.

Exemplo 9: Os anticorpos CD37 biespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc são mais potentes na indução de CDC do que os anticorpos CD37 bivalentes monoespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc devido à ligação monovalente e direcionamento de epítipo duplo

[00386] As mutações F405L ou K409R foram introduzidas em anticorpos CD37 humanizados contendo a mutação E430G, para permitir a

geração de anticorpos biespecíficos (bsIgG1) com dois braços Fab específicos para CD37 que não competem pela ligação a CD37. A capacidade dos anticorpos CD37 biespecíficos que contêm a mutação E430G para induzir CDC foi determinada como descrito acima e comparada à dos anticorpos bivalentes monoespecíficos CD37 contendo a mutação E430G, uma combinação de dois anticorpos bivalentes monoespecíficos CD37 contendo a mutação E430G que não competem pela ligação a CD37 (com a concentração final dos anticorpos combinados idêntica à concentração dos anticorpos biespecíficos individuais), anticorpos CD37 monovalentes contendo a mutação E430G (ou seja, anticorpos biespecíficos contendo um braço Fab específico para CD37 e um braço Fab não ligado derivado de IgG1-b12 e contendo a mutação E430G) ou uma combinação de dois anticorpos CD37 monovalentes contendo a mutação E430G que não competem pela ligação a CD37.

CDC em células Daudi

[00387] A Figura 12A mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G era mais potente que IgG1-005-H1L2-E430G ou IgG1-016-H5L2-E430G na indução de CDC em células Daudi. O bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G biespecífico também foi mais potente do que uma combinação de IgG1-005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G. Anticorpos monovalentes de ligação a CD37 bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G também induziram CDC tão eficiente em células Daudi quanto bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G.

[00388] A Figura 12B mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G era mais potente que IgG1-010-H5L2-E430G ou IgG1-016-H5L2-E430G na indução de CDC em células Daudi. O bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

biespecífico também foi mais potente do que uma combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G. Anticorpos de ligação monovalente bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G também induziram CDC em células Daudi, com bsIgG1-b12-F405L-E430Gx10-H5L2-K409R-E430G sendo menos potente e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G sendo igualmente potente em comparação com bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

[00389] A capacidade de induzir CDC por anticorpos CD37 biespecíficos contendo a mutação E430G também foi comparada à dos anticorpos CD37 biespecíficos sem a mutação E430G. A Figura 13 mostra que bsIgG1-016-H5L2-F405Lx005-H1L2-K409R, bem como bsIgG1-016-H5L2-F405Lx010-H5L2-K409R foram capazes de induzir CDC em células Daudi, mas foram menos potentes ao fazê-lo em comparação com o homólogos de E430G bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

CDC em células OCI-Ly-7

[00390] A Figura 12C mostra que os anticorpos monovalentes de ligação bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G foram mais potentes na indução de CDC em células OCI-Ly-7 comparado às seus homólogos de ligação bivalente monoespecífica, IgG1-016-H5L2-E430G e IgG1-010-H5L2-E430G. A combinação de anticorpos monovalentes de ligação (bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G mais anticorpos bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G) foi mais potente que a IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G), tal como demonstrado por uma EC50 inferior consistente em dois experimentos independentes (Figura 12D). Além disso, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-

K409R-E430G foi mais potente na indução de CDC em células OCI-Ly-7 do que a combinação de anticorpos bivalentes (IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G), tal como demonstrado por uma EC50 inferior consistente em três experimentos independentes (Figura 12E).

[00391] A potência da combinação de anticorpos monovalentes de ligação (bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G mais bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G) e de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G na indução de CDC em células OCI-Ly-7 foi comparável.

CDC em células tumorais primárias da LLC

[00392] A capacidade de anticorpos CD37 biespecíficos contendo a mutação E430G para induzir CDC em células tumorais derivadas de um paciente com LLC foi determinada como descrito acima e comparada com a de anticorpos CD37 contendo a mutação E430G ou uma combinação de anticorpos CD37 contendo a mutação E430G ou anticorpos monovalente CD37 contendo a mutação E430G.

[00393] A Figura 14A mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G era mais potente que IgG1-005-H1L2-K409R-E430G ou IgG1-016-H5L2-F405L-E430G na indução de CDC em células tumorais de LLC primárias. O bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G biespecífico também foi mais potente do que uma combinação de IgG1-005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G. Anticorpos de ligação monovalente bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G também induziram CDC em células tumorais primárias de LLC, mas eram menos eficientes do que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G.

[00394] A Figura 14B mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G era mais potente que IgG1-010-H5L2-

E430G ou IgG1-016-H5L2-E430G na indução de CDC em células primárias de LLC. bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G biespecífico também foi mais potente do que uma combinação de IgG1-010-H5L2-E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G. Anticorpos de ligação monovalente bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G também induziram CDC em células tumorais primárias de LLC, com bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G sendo menos potente e bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G sendo igualmente potente em comparação com bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

Exemplo 10: Anticorpos CD37 biespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc induzem CDC em uma variedade de linhagens celulares de linfoma de células B com uma ampla variedade de expressão de CD37

[00395] A capacidade de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, a uma concentração de 10 µg/mL, para induzir CDC foi determinada (como descrito acima) em uma variedade de linhagens celulares de linfoma de células B, derivado de uma variedade de subtipos de linfoma de células B. Os níveis de expressão de moléculas CD37 na superfície celular dessas linhagens celulares foram determinados por citometria de fluxo quantitativa, tal como descrito acima.

[00396] A Tabela 3 fornece uma visão geral das linhagens celulares testadas.

Tabela 3: Linhagens celulares de linfoma de células B

Linhagem celular	Tipo de linfoma	Fonte
JVM-2	LCM	DSMZ; ACC 12
JVM-13	LCM	ATCC; CRL-3003
Jeko-1	LCM	DSMZ; ACC 553
Z-138	LCM	ATCC; CRL-3001
Daudi	Burkitt's	ATCC; CCL-213
Raji	Burkitt's	ATCC; CCL-86
Wien-133	Burkitt's	BioAnaLab, Oxford, U.K
SU-DHL-8	LDGCB	DSMZ; ACC 573

OCI-Ly19	LDGCB	DSMZ; ACC 528
OCI-Ly7	LDGCB	DSMZ; ACC 688
SU-DHL-4	LDGCB	DSMZ; ACC 495
RC-K8	LDGCB	DSMZ; ACC 561
U-2932	LDGCB	DSMZ; ACC 633
WIL-2S	Plasmablástico	ATCC; CRL-8885
RI-1	LDGCB	DSMZ; ACC 585
WSU-DLCL2	LDGCB	DSMZ; ACC 575

[00397] A Figura 15 mostra que o bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G induziu CDC em uma ampla gama de linhagens celulares de linfoma de células B, derivadas de vários tipos de linfoma de células B.

Exemplo 11: Anticorpos CD37 biespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc são mais potentes na indução de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC)

Rotulagem de células alvo

[00398] A capacidade dos anticorpos CD37 para induzir ADCC foi determinada por um ensaio de liberação de cromo. As células Daudi ou Raji foram coletadas (5×10^6 células/mL) em 1 mL de meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino doador com ferro (DBSI; ThermoFischer, Cat # 10371029) e mistura de penicilina e estreptomicina (pen/estrep), aos quais foram adicionados 100 μ Ci ^{51}Cr (Chromium-51; PerkinElmer, Cat # NEZ030005MC). As células foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 1 hora enquanto eram agitadas. Após a lavagem das células (duas vezes em PBS, 1500 rpm, 5 minutos), as células foram ressuspensas em RPMI 1640/10% DBSI/pen/estrep e contadas por exclusão de azul de tripano. As células foram diluídas para uma densidade de 1×10^5 células/mL.

Preparação de células efectoras

[00399] Células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis (Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram isoladas de 45 mL de sangue recém-colhido de heparina (buffy coat) por centrifugação de densidade Ficoll (Bio Whittaker; meio de separação de linfócitos, cat 17-829E), de acordo com as instruções do fabricante. Após ressuspensão das células em RPMI

1640/10% DBSI/pen/estrep, as células foram contadas por exclusão de azul de tripano e diluídas para uma densidade de 1×10^7 células/mL.

Procedimento de ensaio ADCC

[00400] 50 µL de células alvo marcadas com ^{51}Cr foram pipetadas em placas de microtitulação de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-One; Cat # 650101) e 50 µL de uma série de concentrações de (concentrações finais de 1,5 a 5.000 ng/mL em diluições de 3 vezes) CD37 ou anticorpos de controle, diluídos em RPMI 1640/10% de DBSI/pen/estrep foram adicionadas. As células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e 50 µL de células efectoras foram adicionadas, resultando em uma relação efector-alvo de 100:1. As células foram incubadas durante 4 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Para determinação da lise máxima, 50 µL de células Daudi marcadas com ^{51}Cr (5.000 células) foram incubadas com 100 µL de Triton-X100 a 5%; para determinação da lise espontânea (lise de fundo), 5.000 células Daudi marcadas com ^{51}Cr foram incubadas em 150 µL de meio sem qualquer anticorpo ou células efectoras. O nível de lise celular independente de anticorpo foi determinado incubando 5.000 células Daudi com 500.000 PBMCs sem anticorpo. As placas foram centrifugadas (1200 rpm, 10 minutos) e 25 µL de sobrenadante foram transferidos para 100 µL de solução Microscint-40 (Packard, Cat # 6013641) em placas de 96 poços. As placas foram seladas e agitadas por 15 minutos a 800 rpm e ^{51}Cr liberada foi contada usando um contador de cintilação (TopCount®, PerkinElmer). A porcentagem de lise específica foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de lise específica} = (\text{amostra cpm} - \text{lise espontânea cpm}) / (\text{lise máxima cpm} - \text{lise espontânea cpm})$$

em que cpm é contagens por minuto.

[00401] A Figura 16A mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G era mais potente do que a combinação IgG1-005-H1L2-K409R-E430G ou IgG1-016-H5L2-F409L-E430G ou IgG1-

005-H1L2-K409R-E430G mais IgG1-016-H5L2-F405L-E430G na indução de ADCC em células Daudi.

[00402] A Figura 16B mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G era mais potente que IgG1-010-H5L2-E430G ou IgG1-016-H5L2-E430G ou uma combinação de IgG1-010 -E430G mais IgG1-016-H5L2-E430G na indução de ADCC em células Daudi.

[00403] A Figura 16C mostra resultados semelhantes aos da Figura 16B para PBMCs de um doador diferente e, além disso, mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G era mais potente do que os anticorpos de ligação monovalente bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G e bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G na indução de ADCC em células Raji.

Exemplo 12: Anticorpos CD37 biespecíficos com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc induzem CDC *ex vivo* potente em células tumorais primárias de pacientes com várias neoplasias malignas de células B

[00404] A eficácia do CDC de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G foi analisada usando células tumorais primárias derivadas de pacientes de cinco neoplasias malignas de células B diferentes: leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma de células do manto (LCM) e linfoma não Hodgkin (ainda não especificado). Todas as amostras de pacientes foram obtidas após consentimento informado por escrito e armazenadas usando protocolos aprovados pelo Comitê de Ética Médica da VUmc, de acordo com a declaração de Helsinque. As células mononucleares da medula óssea do paciente (BMNCs) ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por centrifugação de gradiente de densidade (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) a partir de aspirados de medula óssea ou amostras de sangue periférico de pacientes. As células foram usadas diretamente ou

armazenadas em nitrogênio líquido até uso posterior.

[00405] O tecido linfonodal do paciente foi dissecado em pequenos fragmentos e coletado em meio α -MEM (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) contendo Penicilina-Estreptomicina a 1%, heparina a 0,2% e lisado de plaquetas a 5% e deixado durante a noite a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante (compartimento de células não estromais, incluindo células tumorais) foi coletado e as células foram filtradas usando um filtro Easy de 70 μ M (Greiner Bio-one). As células foram contadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 25% de FBS inativado pelo calor e 10% de DMSO e congeladas em nitrogênio líquido até uso posterior.

[00406] Os níveis de expressão de proteínas reguladoras de CD37 e de complemento de membrana (mCRP; CD46, CD55 e CD59) em células de pacientes isoladas foram determinados usando um QifiKit (DAKO, No. de cat. K007811). As células foram incubadas com os anticorpos purificados CD37 (BD, No. de cat. 555456), CD46 (BioLegend, No. de cat. 352404), CD55 (BioLegend, No. de cat. 311302), CD59 (BioLegend, No. de cat. 304702) e b12 (Genmab) a 4 °C por 30 minutos. Depois disso, foi utilizado o método fornecido pelo fabricante do QifiKit. Após a etapa final do procedimento do Qifikit, as células foram incubadas com marcadores específicos de células de linfoma para permitir a identificação de células tumorais. A Figura 17 mostra os níveis de expressão por indicação.

[00407] As células tumorais derivadas do paciente foram opsonizadas com 10 μ g/mL ou 100 μ g/mL de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G e a indução de CDC foi avaliada na presença de 20% de NHS reunido. Os seguintes marcadores celulares foram utilizados para identificar diferentes populações celulares: CD45-KO (Beckman Coulter B36294), CD19-PC7 (Beckman Coulter, No. de cat. IM3628), CD3-V450 (BD, No. de cat. 560365), CD5-APC (BD, No. de cat. 345783), CD5-PE (DAKO, No. de cat. R084201), CD10-APC-H7 (BD, No. de cat. 655404),

CD10-PE (DAKO, No. de cat. R084201), CD23-FITC (Biolegend, No. de cat. 338505), lambda-APC-H7 (BD, No. de cat. 656648), kappa-PE (DAKO, No. de cat. R043601) e lambda-FITC (Emelca Bioscience CYT-LAMBF). Na população de células CD45+, as células B malignas foram definidas por diferentes marcadores, dependendo da indicação: CD3-/CD19+/CD5+ (LLC), CD3-/CD19 +/CD10 + (FL, LDGCB), CD3-/CD19+/CD5+/CD23- (LCM). Caso as células B malignas não pudessem ser identificadas com base nesses marcadores, as células malignas foram identificadas com base na clonalidade usando coloração kappa/lambda. Em algumas amostras, as células B malignas também não puderam ser identificadas com base na clonalidade; nesses casos, a população total de células B foi avaliada, sem distinção entre células B normais e malignas. A extinção foi calculada como a fração de 7-amino actinomicina D (7-AAD; BD, No. de cat. 555816) de células B malignas positivas (%) determinadas por um citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA).

[00408] A Figura 18 mostra que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G era altamente potente (lise de mais de 50%) na indução de CDC em células tumorais de pacientes com LLC, LF, LCM, LDGCB ou B-LNH (ainda não especificado). Nas células de um paciente com LF recidivante/refratária, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G foi menos capaz de induzir CDC.

Exemplo 13: Ligação de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc a células B humanas ou de macaco cinomolgo no sangue total e indução de citotoxicidade em células B no sangue total

Ligação a células B humanas ou de macacos cinomolgos

[00409] A ligação a células B humanas ou de macaco cinomolgo foi determinada em um ensaio de ligação ao sangue total. O sangue humano tratado com heparina de voluntários saudáveis foi derivado de UMC Utrecht

(Utrecht, Países Baixos), o sangue tratado com hirudina de macacos cinomolgo foi derivado de Covance (Münster, Alemanha). O sangue foi aliquotado para os poços de uma placa de fundo redondo de 96 poços (Greiner Bio-one, No. de cat. 65010; 35 µL/poço). Os glóbulos vermelhos (RBC) foram lisados por adição de 100 µL de tampão de lise RBC (KHCO₃ 10 mM [Sigma P9144], EDTA 0,1 mM [Fluka 03620] e NH₄CL 0,15 mM [Sigma A5666]) e incubados em gelo até a lise de RBC estar completa. Após centrifugação por 3 minutos a 300xg, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com diluições em série (concentração final de anticorpo de 0,014 a 30 µg/mL em diluições em série 3x) de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L marcado com Alexa-488 -E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou Alexa-488 IgG1 de controle marcado (IgG1-b12) e um anticorpo diretamente marcado para identificar células B (entre uma mistura de anticorpos para identificar subconjuntos de células sanguíneas):

Para células B do sangue humano, foi utilizado o seguinte anticorpo

Proteína alvo	Clone	Rótulo	Células alvo	Empresa	No. de cat.
CD19	HIB19	BV711	Células B	Biolegend	302245

Para células B do sangue de macaco cinomolgo, foi utilizado o seguinte anticorpo

Proteína alvo	Clone	Rótulo	Células alvo	Empresa	No. de cat.
CD19	J3-119	PE	Células B	Beckman Coulter	A07769

[00410] As células foram sedimentadas e lavadas duas vezes em 150 µL de tampão FACS e ressuspensas em 150 µL de TO-PRO-3 (concentração final de 0,2 µM; Molecular Probes, No. de cat. T3605). As amostras foram medidas por citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo LSRFortessa. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência A488 para células B viáveis TO-PRO-3-/CD14-/CD19+ (humanas) ou células B viáveis TO-PRO-3-/CD14-/CD19+/CD20+ (macaco cinomolgo). Os dados transformados em log foram analisados usando os valores de melhor ajuste de

um ajuste de resposta à dose não linear no GraphPad PRISM.

[00411] A Figura 19 mostra a ligação dependente da concentração de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G a células B em (A) sangue humano e (B) de macaco cinomolgo, para um doador/animal representativo. Os valores médios de EC50 para ligação a células B humanas e de macaco cinomolgo estavam no mesmo intervalo ([0,85 µg/mL ± 0,284 com base na ligação às células B no sangue de 6 doadores humanos] e [0,63 µg/mL ± 0,228 com base na ligação para células B no sangue de 4 animais], respectivamente), indicando que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G mostra ligação comparável ao CD37 humano e de macaco cinomolgo.

Citotoxicidade para células B humanas ou de macaco cinomolgo

[00412] A citotoxicidade para células B humanas ou de macaco cinomolgo foi determinada em um ensaio de citotoxicidade no sangue total. O sangue humano tratado com hirudina de voluntários saudáveis foi derivado de UMC Utrecht (Utrecht, Países Baixos), o sangue tratado com hirudina de macacos cinomolgo foi derivado de Covance (Münster, Alemanha). O sangue foi dividido em alíquotas nos poços de uma placa de fundo redondo de 96 poços, 35 µL/poço.

[00413] Foram adicionadas diluições em série (concentração final de anticorpo de 0,0005 a 10 µg/mL em diluições em série 3x; volume final 100 µL/poço) de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou IgG1-b12. Nos ensaios de citotoxicidade utilizando sangue total humano, incluiu-se como referência o anticorpo IgG1-G28.1-S239D-I332E específico para CD37, aumentado por interação FcγR. As amostras foram incubadas a 37 °C por 4 horas. Posteriormente, os glóbulos vermelhos foram lisados como descrito acima e as amostras foram coradas para identificar células B, como descrito acima. As células foram sedimentadas e lavadas duas vezes em 150 µL de tampão FACS e ressuspensas em 150 µL de TO-

PRO-3 (concentração final de 0,2 µM; Molecular Probes, No. de cat. T3605). As amostras foram medidas por citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo LSRFortessa. Após exclusão dos dupletos, determinou-se a porcentagem de células B viáveis TO-PRO-3-/CD14-/CD19+ (humanas) ou células B viáveis TO-PRO-3-/CD14-/CD19+/CD20+ (de macaco cinomolgo). A porcentagem de depleção de células B foi calculada da seguinte forma: % de depleção de células B = $100 * [(\% \text{ de células B sem controle de Ab} - \% \text{ de amostra de células B}) / (\% \text{ de células B sem controle de Ab})]$. Os dados transformados em log foram analisados usando os valores de melhor ajuste de um ajuste de resposta à dose não linear no GraphPad PRISM.

[00414] A Figura 20 mostra a citotoxicidade dependente da concentração de células bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G para células B em (A) sangue humano e (B) de macaco cinomolgo, para um doador/animal representativo.

[00415] Com base no EC50, a capacidade de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G de induzir citotoxicidade em células B humanas e de macaco cinomolgo foi comparável: a EC50 média para citotoxicidade em células B humanas (no sangue de 6 doadores) foi de 0,077 µg/mL ± 0,039; a EC50 média para citotoxicidade em células B de macaco cinomolgo (no sangue de 4 animais) foi de 0,043 µg/mL ± 0,019.

[00416] A Figura 20A também mostra a citotoxicidade do anticorpo monoclonal CD37 IgG1-G28.1-S239D-I332E melhorado pela interação FcγR para células B humanas para um doador representativo que respondeu, que mostrou menor citotoxicidade do que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G. Nas células B de 3 doadores que responderam, foi medida uma depleção máxima de 50% das células B por IgG1-G28.1-S239D-I332E, enquanto em 3 outros doadores não foi medida citotoxicidade para as células B por esse anticorpo. bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G induziu a citotoxicidade em

93 a 99% das células B em 6/6 doadores. A ligação de IgG1-G28.1-S239D-I332E a CD37 expressa em células Daudi foi comparável à de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (dados não mostrados).

Exemplo 14: Atividade potente de CDC por uma combinação de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc com um anticorpo específico para CD20

[00417] A capacidade de induzir CDC foi testada para uma combinação de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e um anticorpo anti-CD20 (IgG1-CD20-ofa; ofatumumab) em células tumorais de LLC derivadas de pacientes obtidas da ConversantBio (Huntsville, Alabama, EUA). Os PBMCs derivados dos pacientes foram ressuspensos em RPMI contendo BSA a 0,2% (albumina de soro bovino) e semeados em placas de poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Greiner bio-one No. de cat. 650101) a uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/poço (30 μ L/poço) e 50 μ L de uma série de concentrações de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (0,0625 a 0,05 μ g/mL) e IgG1-CD20-ofa (1 a 8 μ g/mL) foram adicionados em diluições de 2 vezes. bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG1-CD20-ofa foram combinados em concentrações de anticorpos baseadas na potência relativa (diferenças nas EC50s) de cada um dos anticorpos, misturando duas concentrações que atingiria, em média, o mesmo efeito separadamente. IgG1-b12 foi usado como controle negativo.

[00418] Após a incubação (temperatura ambiente, 15 minutos enquanto agitava), 20 μ L de soro humano normal reunido (NHS No. de cat. M0008 Sanquin, Amsterdã, Holanda) foram adicionados a cada poço, como fonte de complemento e as placas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos. A reação foi parada esfriando as placas em gelo. Após centrifugação por 3 minutos a 300xg, as células foram lavadas duas vezes com 150 μ L de tampão FACS e

incubadas por 30 minutos a 4 °C com um anticorpo IgG1-CD19 anti-humano marcado com R-Ficoeritrina (PE) (clone J3-119, Beckman Coulter, No. de cat. A07769, 1:50 diluído em estoque) para determinar as células B do tumor e TO-PRO-3 (concentração final de 0,2 µM; Molecular Probes, No. de cat. T3605) para a identificação de células mortas. As células foram sedimentadas e lavadas duas vezes em 150 µL de tampão FACS e medidas por citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo LSRFortessa. A porcentagem de células viáveis foi calculada da seguinte forma: % de células viáveis = 100 * (No. de eventos negativos para TO-PRO-3)/(No. total de eventos).

[00419] As Figuras 21A a D mostram que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e ofatumumab induziram a CDC em células tumorais derivadas de 2 pacientes com LLC, com a atividade de CDC aumentando com o aumento dos níveis de dose. A combinação de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G com ofatumumab resultou em atividade CDC melhorada em todas as concentrações testadas em ambos os pacientes testados, embora esses efeitos fossem menos evidentes em concentrações mais altas de anticorpos, onde a exterminação da célula quase completa foi induzida pelos agentes sozinhos (Figura 21A e B). Estes resultados indicam que a adição de ofatumumab a bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G pode melhorar a exterminação de células tumorais mediada por CDC em células B malignas obtidas de pacientes com LLC.

Exemplo 15: Atividade antitumoral de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc em modelos de xenoenxerto de malignidades de células B

Atividade antitumoral em um modelo subcutâneo de xenoenxerto de leucemia de células B crônica humana JVM-3

[00420] As células JVM-3 (1×10^7) foram inoculadas no flanco direito dos camundongos CB17.SCID e tratamento com anticorpos (3 doses semanais

de 0,1, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg, injetadas por via intravenosa; IgG1-b12 foi usada como controle negativo, administrado a 10 mg/kg) foi iniciado quando os tumores atingiram um volume médio de aproximadamente 158 mm³. Os volumes tumorais foram medidos duas vezes por semana em duas dimensões usando um paquímetro, e o volume foi expresso em mm³ usando a fórmula: $V = (C \times L \times P) / 2$, onde V é o volume do tumor, L é o comprimento do tumor (o tumor mais longo em dimensão) e W é a largura do tumor (a maior dimensão do tumor perpendicular a L).

[00421] A Figura 22A mostra o volume do tumor por grupo de doses ao longo do tempo, a Figura 22B mostra os volumes do tumor por camundongo por grupo de doses no dia 25, quando todos os grupos ainda estavam completos. Três doses semanais de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G a 1, 3 ou 10 mg/kg reduziram significativamente o crescimento do tumor de células JVM-3, enquanto a dosagem a 0,1 ou 0,3 mg/kg não afetou o crescimento do tumor (teste de Mann Whitney, $p < 0,01$).

Atividade antitumoral no modelo de xenoenxerto de linfoma de Daudi-luc Burkitt intravenoso

[00422] No dia 0, camundongos SCID (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid; Harlan) foram injetados por via intravenosa com células Daudi-luc (célula Daudi transfectada com luciferase, $2,5 \times 10^6$ células/camundongo). Nos dias 14, 21 e 28, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 0,1, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G. IgG1-b12 foi usado como anticorpo de controle negativo, dosado a 10 mg/kg. O crescimento do tumor foi avaliado semanalmente (a partir do dia 2) por imagem de bioluminescência (BLI). Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 100 µL de D-luciferina de vagalume (30 mg/mL; Caliper LifeSciences, No. de cat. 119222) e a bioluminescência (radiância em p/s/cm²/sr [fótons por segundo por cm²]

por radiano quadrado]) foi medido sob anestesia com isoflurano usando um sistema de imagem de bioluminescência biospace (PerkinElmer; camundongos foram fotografados a partir do local dorsal).

[00423] A Figura 23A mostra a atividade da luciferase (bioluminescência, tal como uma medida do volume do tumor) por grupo de doses ao longo do tempo. A Figura 23B mostra a atividade da luciferase por camundongo por grupo de doses no dia 36, quando todos os grupos ainda estavam completos. Três doses semanais de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G a 0,1, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg reduziram significativamente o crescimento *in vivo* de células Daudi-luc (One Way Anova, LSD de Fisher não corrigido).

Exemplo 16: Avaliação da depuração plasmática de um anticorpo biespecífico CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc em camundongos SCID

[00424] Camundongos SCID fêmeas de 11 a 12 semanas de idade (CB-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid; Harlan) (3 camundongos por grupo) foram injetados por via intravenosa (iv) com uma dose única de 100 µg (5 mg/kg) ou 500 µg (25 mg/kg) de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G ou IgG1-b12. O experimento foi configurado para estudar a depuração de anticorpos na ausência de depuração mediada por alvo, uma vez que nem absIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, nem IgG1-b12 apresentam reatividade cruzada com o camundongo.

[00425] Amostras de sangue de 50 a 100 µL foram coletadas da veia safena em 10 minutos, 4 horas, 24 horas, 2 dias, 7 ou 8 dias, 14 dias e 21 dias após a administração do anticorpo. O sangue foi coletado em frascos contendo heparina e centrifugado por 5 minutos a 10.000 g. As amostras de plasma foram diluídas 1:50 para camundongos tratados com 5 mg/kg (amostra de 20 µL em 980 µL de PBSA (PBS suplementado com albumina de soro bovino a

0,2% (BSA)) e 1:20 para camundongos tratados com 25 mg/kg (20 µL de amostra em 380 µL de PBSA) e armazenados a -20 °C até a determinação das concentrações de mAb.

[00426] As concentrações de IgG humana foram determinadas usando um ELISA sanduíche. Clone de IgG-kappa anti-mAb humano MH16 de camundongo (CLB Sanquin, Holanda; No. de cat. M1268), revestido em 100 µL durante a noite a 4 °C e placas Microlon ELISA de 96 poços (Greiner, Alemanha) a uma concentração de 2 µg/mL, foi usado como anticorpo de captura. Após o bloqueio das placas com PBSA por 1 hora à temperatura ambiente, as amostras foram adicionadas, diluídas em série em PBSA e incubadas em um agitador de placas por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (PBS suplementado com 0,05% de Tween 20) e subsequentemente incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com imunoglobulina IgG anti-humana de cabra (Jackson, West Grace, PA; No. de cat. 109-035-098; 1:10.000 em PBST suplementado com BSA a 0,2%). As placas foram lavadas novamente três vezes com 300 µL de PBST antes da incubação com ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemanha) protegido da luz. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido oxálico a 2%. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm. A concentração de IgG humana foi calculada usando o material injetado como uma curva de referência. Como controle de placa, incluiu-se IgG1 humana purificada (o local de ligação, No. de cat. BP078). As concentrações de IgG humana (em µg/mL) foram plotadas (Figura 24A e C) e a área sob a curva (AUC) foi calculada usando Graphpad Prism 6.0. A depuração de IgG até o último dia da coleta de sangue (dia 21) foi determinada pela fórmula $D * 1.000/AUC$, na qual D é a dose da injeção (1 mg/kg) (Figura 24B e D).

[00427] Não houve diferenças substanciais entre as taxas de depuração

plasmática de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G e IgG1-b12, demonstrando que bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G mostrou um perfil farmacocinético comparável ao da IgG1 humana do tipo selvagem na ausência de ligação ao alvo.

Exemplo 17: Determinação da contribuição de resíduos de aminoácidos CD37 na ligação de anticorpos CD37 usando varredura de alanina

Projeto de biblioteca

[00428] Foi sintetizada uma biblioteca de alanina de único resíduo CD37 (Geneart), na qual todos os resíduos de aminoácidos (aa) nos domínios extracelulares do CD37 humano (Uniprot P11049) foram mutados individualmente para alaninas, exceto para posições que já continham alaninas ou cisteínas. As cisteínas não sofreram mutações para minimizar a chance de rompimento estrutural do antígeno. A biblioteca foi clonada no vetor de expressão pMAC contendo uma cassete de expressão CMV/TK-poliA, um gene de resistência a Amp e uma origem de replicação de pBR322.

Produção e triagem de bibliotecas

[00429] Os mutantes CD37 e alanina do tipo selvagem foram expressos individualmente em células FreeStyle HEK293 de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Scientific). Um dia após a transfecção, as células foram coletadas. Aproximadamente 100.000 células foram incubadas com 20 µL de bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (ligação monovalente 010) ou de bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx conjugado com Alexa488) a uma concentração de 3 µg/mL em tampão FACS (PBS + 0,1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) + 0,02% (p/v) de azida de sódio). As células foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Subsequentemente, as células foram lavadas duas vezes adicionando 150 µL de tampão FACS e removendo o sobrenadante após centrifugação. As células foram ressuspensas em 20 µL de tampão FACS fresco e armazenadas a 4 °C

até análise por citometria de fluxo usando uma peneira iQue (IntelliCyt). Todo o experimento foi realizado 2 vezes.

Análise de dados

[00430] Para cada amostra, a ligação média do anticorpo por célula foi determinada como a média geométrica da intensidade da fluorescência (gMFI) para a população de células não bloqueadas. A gMFI é influenciada pela afinidade do anticorpo para o mutante CD37 e pelo nível de expressão do mutante CD37 por célula. Como mutações específicas de alanina podem afetar o nível de expressão da superfície do mutante CD37 e para corrigir diferenças de expressão para cada mutante CD37 em geral, os dados foram normalizados contra a intensidade de ligação de um anticorpo de controle específico não competitivo para CD37 (neste exemplo, anticorpos monovalentes a ligação 010 e a ligação monovalente 016 eram anticorpos não concorrentes e um anticorpo foi usado como controle para o outro anticorpo), usando a seguinte equação:

$$gMFI_{\text{posição aa}}^{\text{normalizado}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{Ab de teste}}}{gMFI_{\text{Ab de controle}}} \right)$$

[00431] Na qual 'posição aa' se refere a uma posição mutante de alanina específica em CD37 ou CD37 de tipo selvagem (em peso).

[00432] Para expressar perda ou ganho de ligação dos anticorpos, a pontuação padrão foi determinada de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{pontuação Z (alteração de dobra)} = \frac{gMFI_{\text{posição aa}}^{\text{normalizado}} - \mu}{\sigma}$$

onde μ e σ são a média e o desvio padrão (DP) do gMFI normalizado de todos os mutantes.

[00433] O ganho de ligação na maioria dos casos será causado pela perda de ligação do anticorpo de referência a mutantes ala específicos.

Usando esses cálculos, as posições de aminoácidos para as quais, ao substituir o aminoácido por alanina, não há perda ou ganho de ligação por um anticorpo específico, resultarão em uma pontuação Z de '0', o ganho de ligação resultará em 'pontuação $Z > 0$ ' e a perda da ligação resultará em 'pontuação $Z < 0$ '. Para corrigir a variação da amostra, apenas os resíduos de aminoácidos CD37 em que a pontuação Z foi menor que -1,5 foram considerados 'perda de mutantes de ligação'. No caso de o gMFI do anticorpo de controle para um determinado mutante CD37 ser menor que o gMFI-2,5xSD médio do gMFIControl Ab médio, os dados foram excluídos da análise (como para os mutantes CD37, foi assumido que os níveis de expressão não eram suficientes).

[00434] A Figura 25 mostra a 'pontuação Z (alteração de dobra)' dos anticorpos CD37 para variantes de CD37 com mutações ala nas posições 42 a 131 (de acordo com a SEQ ID NO: 94). Os resultados indicam que:

- a ligação do anticorpo 010 é pelo menos dependente dos aa Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 e P199 do CD37 humano,
- a ligação do anticorpo 016 é pelo menos dependente dos aa E124, F162, Q163, V164, L165 e H175 do CD37 humano.

Em resumo

[00435] Em resumo, os anticorpos biespecíficos compostos por dois anticorpos específicos para CD37 que não competem pela ligação ao alvo com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc, mostraram a combinação mais favorável de potência CDC e ADCC em células tumorais CD37 positivas. Para ambos os mecanismos efetores, os anticorpos biespecíficos com a mutação que melhora a interação Fc-Fc mostraram potência superior em comparação à combinação de dois anticorpos CD37 não concorrentes contendo a mutação que melhora a interação Fc-Fc ou aos anticorpos CD37 sozinhos com a mutação que melhora a interação Fc-Fc.

Exemplo 18: Avaliação *in vitro* da atividade CDC de misturas de novos anticorpos CD37 melhorados com hexamerização com produtos de

anticorpos CD20 estabelecidos clinicamente em células Raji.

[00436] A atividade CDC de misturas de anticorpos CD37 com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc, IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-E430G, IgG1-005-E430G, IgG1-010-E430G e IgG1-016-E430G (os últimos 4 sendo coelho quimérico/humano), mais os produtos de anticorpos monoclonais direcionados para CD20 clinicamente estabelecidos MabThera (rituximabe; Roche, H0124B08), Arzerra (ofatumumab; Novartis; C656294) e Gazyva (obinutuzumabe, GA101; Roche, D287-41A GACD20) foi testada *in vitro* utilizando células Raji do linfoma de Burkitt. As células Raji (ATCC, No. de cat. CCL-86) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS inativado pelo calor, 1 U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina e L-glutamina 4 mM. $0,1 \times 10^6$ células Raji foram pré-incubadas com anticorpos em um volume total de 80 µL de RPMI/BSA a 0,2% por poço por 15 minutos em um agitador à temperatura ambiente. Em seguida, o NHS foi adicionado às células pré-incubadas até um volume final de 100 µL (concentrações finais de anticorpos 10 µg/mL; 20% NHS) e incubado por 45 minutos a 37 °C. Para todas as concentrações totais de anticorpos testadas, foram testadas diferentes proporções dos dois anticorpos nas misturas (1:0 - 3:1 - 1:1 - 1:3 - 0:1). As placas foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em 30 µL de PI (2 µg/mL). A extinção foi calculada como a fração de células positivas para PI (%) determinada por citometria de fluxo em um rastreador iQue (Intellicyt). Os dados foram analisados e plotados no software GraphPad Prism.

[00437] As misturas dos anticorpos CD37 testados com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc e os produtos de anticorpos CD20 clinicamente estabelecidos mostraram atividade CDC dependente da dose aumentada em comparação com a mesma concentração dos anticorpos únicos nas células Raji (Figura 8). Houve pouca diferença na atividade de CDC nas diferentes proporções testadas dos dois anticorpos nas misturas (1:3, 1:1 ou 3:1). Esses

dados indicam que a mistura de um anticorpo CD37 melhorado com hexamerização com uma mutação que melhora a interação Fc-Fc mais um produto anticorpo CD20 estabelecido clinicamente, tal como MabThera, Arzerra (anticorpos CD20 tipo I) ou Gazyva (anticorpo CD20 tipo II), pode melhorar o potencial terapêutico de pacientes com neoplasias de células B, que frequentemente se tornam refratárias apenas às terapias padrão direcionadas a CD20.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo biespecífico, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira e uma segunda regiões de ligação ao antígeno que se ligam a CD37 humano com a sequência da SEQ ID NO: 62 e uma primeira e uma segunda regiões Fc de uma imunoglobulina humana, em que a primeira e a segunda regiões de ligação ao antígeno se ligam a diferentes epítomos em CD37, e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem uma ou mais mutações de aminoácidos cuja(s) mutação(ões) aprimora(m) a interação Fc-Fc entre os anticorpos biespecíficos após a ligação ao alvo ligado à membrana em comparação com a interação Fc-Fc entre os anticorpos biespecíficos não tendo a(s) referida(s) mutação(ões).

2. Anticorpo biespecífico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,
sequência VL CDR2: KAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010].

3. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,

sequência VL CDR2: KAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010].

4. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16,

sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20,

sequência VL CDR2: KAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010].

5. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno compreende as sequências VH e VL:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 15 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 19 ou

(ii) sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e as sequências VL das SEQ ID NOs: 15 e 19.

6. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno se liga a um epítipo funcional que compreende um ou mais dos aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 e P199 da SEQ ID No: 62 (CD37).

7. Anticorpo biespecífico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno

é obtida a partir de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
sequência VL CDR2: AAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

8. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 7, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
sequência VL CDR2: AAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

9. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a referida primeira região de ligação ao antígeno compreende as sequências de CDR:

sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 13,
sequência VL CDR2: AAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

10. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 7 a 9, caracterizado pelo fato de que a referida primeira

região de ligação ao antígeno compreende as sequências VH e VL:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 8 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 12 ou

(ii) sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e as sequências VL das SEQ ID NOs: 8 e 12.

11. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida segunda região de ligação ao antígeno é obtida de um anticorpo que compete pela ligação ao CD37 humano com um anticorpo CD37 compreendendo as sequências CDR selecionadas do grupo compreendendo:

- (i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
sequência VL CDR2: YAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016];
- (ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,
sequência VL CDR2: EAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 [004];
- (iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,
sequência VL CDR2: FAK e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1];

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,
sequência VL CDR2: IVA e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 [37.3].

12. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida segunda região de ligação ao antígeno se liga ao mesmo epítipo no CD37 humano que um anticorpo CD37 que compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que compreende:

(i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
sequência VL CDR2: YAS e
sequência VL CDL3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016];
(ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,
sequência VL CDR2: EAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 [004];
(iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,

sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,
 sequência VL CDR2: FAK e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1];

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,
 sequência VL CDR2: IVA e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 [37.3].

13. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida segunda região de ligação ao antígeno se liga a um epítipo funcional que compreende um ou mais dos aminoácidos selecionados do grupo que consiste em: E124, F162, Q163, V164, L165 e H175 da SEQ ID No: 62 (CD37).

14. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida segunda região de ligação ao antígeno compreende as sequências de CDR selecionadas do grupo que compreende:

(i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27,
 sequência VL CDR2: YAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016];
 (ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4,

sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6,
 sequência VL CDR2: EAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 **[004]**;
 (iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44,
 sequência VL CDR2: FAK e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 **[G28.1]**;

e

(iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51,
 sequência VL CDR2: IVA e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 **[37.3]**.

15. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a referida segunda região de ligação ao antígeno compreende as sequências VH e VL selecionadas do grupo que compreende:

(i) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 22 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 26 ou

(ii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 1 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 5 ou

(iii) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 39 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 43 ou

(iv) sequência VH estabelecida na SEQ ID NO: 46 e sequência VL estabelecida na SEQ ID NO: 50 ou

(v) uma sequência VH com pelo menos 90% de identidade, tal

como pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade e uma sequência VL com pelo menos 90% de identidade, tal como em pelo menos 95% de identidade, tal como pelo menos 98% de identidade, tal como pelo menos 99% de identidade com a sequência VH e a sequência VL, respectivamente, conforme estabelecido em qualquer um de (i) a (iv).

16. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc são substituições de aminoácidos.

17. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc são substituições de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 em IgG1 humana ao usar o sistema de numeração da UE.

18. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma substituição nas referidas primeira e segunda regiões Fc selecionadas do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

19. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma substituição nas referidas primeira e segunda regiões Fc selecionadas de E430G ou E345K, de um modo preferido E430G.

20. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as referidas mutações que melhoram a interação Fc-Fc nas referidas primeira e segunda regiões Fc são substituições idênticas nas referidas primeira e segunda regiões Fc.

21. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo biespecífico é um isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 ou uma combinação dos mesmos, de preferência é um isotipo IgG1.

22. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo biespecífico é um anticorpo completo.

23. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo biespecífico é humano, humanizado ou quimérico ou uma combinação dos mesmos.

24. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o anticorpo biespecífico se liga ao CD37 humano e de cinomolgo, tendo as sequências estabelecidas nas SEQ ID Nos 62 e 63, respectivamente.

25. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que

A) a primeira região Fc compreende outra mutação correspondente a F405L na IgG1 humana e a segunda região Fc compreende uma outra mutação correspondente a K409R na IgG1 humana, ou

B) a segunda região Fc compreende outra mutação correspondente a F405L na IgG1 humana e a primeira região Fc compreende uma mutação adicional correspondente a K409R na IgG1 humana

ao usar a numeração da UE.

26. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de ter aumentado o CDC ou aumentado as funções efetoras do CDC e ADCC em comparação com um anticorpo biespecífico idêntico, mas que não possui as mutações que melhoram a interação Fc-Fc.

27. Anticorpo anti-CD37, caracterizado pelo fato de que se liga ao mesmo epítopo no CD37 humano como um anticorpo anti-CD37 cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

28. Anticorpo anti-CD37 de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 16, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 17 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 20 e sequência CDR2: KAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 21 [010]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 9, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 10 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 113 e sequência CDR2: AAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 14 [005].

29. Anticorpo anti-CD37, caracterizado pelo fato de que se liga ao CD37 humano cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 23, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 25 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 27 e sequência CDR2: YAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 28 [016]; ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 2, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 3 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 4 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 6 e sequência CDR2: EAS e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 7 [004].

30. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 29, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende uma região Fc que compreende uma ou mais mutações de aminoácidos cuja(s) mutação(ões) melhora(m) a interação Fc-Fc entre os anticorpos após a ligação ao alvo em comparação com a interação Fc-Fc entre anticorpos que não possuem a(s) referida(s) mutação(ões).

31. Anticorpo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais mutações de aminoácidos na região Fc do anticorpo são substituições de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes às posições de aminoácidos 430, 440 e 345 na IgG1 humana ao usar a numeração do sistema da UE.

32. Anticorpo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma substituição de aminoácidos na região Fc selecionada do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

33. Anticorpo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma substituição na referida região Fc selecionada de E430G ou E345K, de um modo preferido E430G.

34. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, caracterizado pelo fato de que compreende uma mutação correspondente a F405L ou K409R na IgG1 humana.

35. Anticorpo anti-CD37, caracterizado pelo fato de que se liga ao CD37 humano cujo anticorpo compreende:

(i) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 40, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 41 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 42 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 44 e sequência CDR2: FAK e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 45 [G28.1] ou

(ii) uma região VH compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 49 e uma região VL compreendendo uma sequência CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 51 e sequência CDR2: VAT e sequência CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 52 [37.3];

(iii) e em que o anticorpo de (i) ou (ii) compreende uma região Fc compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada do grupo que compreende: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W; e

(iv) em que opcionalmente a região Fc compreende adicionalmente uma mutação de K409R ou F405L.

36. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 35, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

37. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é humano, humanizado ou quimérico.

38. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 37, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga ao CD37 humano e de cinomolgo.

39. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

40. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 38, ou composição de acordo com a reivindicação 39, caracterizado(a) pelo fato de ser para uso como medicamento.

41. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 38, ou composição de acordo com a reivindicação 39, caracterizado(a) pelo fato de ser para uso no tratamento de câncer ou doença autoimune ou distúrbio inflamatório.

42. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 38, ou composição de acordo com a reivindicação 39, caracterizado(a) pelo fato de ser para uso no tratamento de alergias, rejeição de transplante ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA).

43. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou anticorpo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 27 a 38, ou composição de acordo com a reivindicação 39 para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 42, caracterizado(a) pelo fato de ser em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

44. Anticorpo biespecífico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 38, ou composição de acordo com a reivindicação 39 para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 43, caracterizado(a) pelo fato de que o um ou mais agentes terapêuticos adicionais é selecionado do grupo que compreende : doxorrubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, vincristina, fludarabina, ibrutinibe e um anticorpo anti-CD20, tal como rituximabe ou ofatumumabe.

45. Anticorpo biespecífico de acordo com a reivindicação 43 ou 44, ou anticorpo de acordo com a reivindicação 43 ou 44, ou composição a reivindicação 43 ou 44 para uso de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-CD20 capaz de ligação ao CD20 humano compreendendo as sequências de CDR selecionadas do grupo que consiste em:

- i) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 75,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 76,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 77,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 79
 sequência VL CDR2: DAS e
 sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 80;
- ii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 82,
 sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 83,
 sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 84,
 sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 85
 sequência VL CDR2: DAS e

sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 86;
iii) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 95,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 96,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 97,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 99,
sequência VL CDR2: ATS, e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 100;
iv) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 88,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 89,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 90,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 92
sequência VL CDR2: DAS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 93; e
v) sequência VH CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 102,
sequência VH CDR2 estabelecida na SEQ ID NO: 103,
sequência VH CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 104,
sequência VL CDR1 estabelecida na SEQ ID NO: 106
sequência VL CDR2: QMS e
sequência VL CDR3 estabelecida na SEQ ID NO: 107.

46. Uso do anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38 ou da composição como definida na reivindicação 39, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento.

47. Uso de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, doença autoimune ou doença inflamatória.

48. Uso de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de alergias, rejeição de transplantes ou malignidade de células B, tal como linfoma não

Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA).

49. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, caracterizado pelo fato de ser em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

50. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o um ou mais agentes terapêuticos adicionais é selecionado do grupo que compreende: doxorrubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, vincristina, fludarabina, ibrutinibe e um anticorpo anti-CD 20, tal como rituximabe ou ofatumumabe.

51. Método para induzir a morte celular, ou inibir o crescimento e/ou a proliferação de uma célula tumoral que expressa CD37, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um indivíduo com necessidade do(a) mesmo(a) uma quantidade eficaz do anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38 ou a composição como definida na reivindicação 39.

52. Método de tratamento de um indivíduo com alergia, doença autoimune, doença inflamatória, rejeição de transplante ou malignidade de células B, tal como linfoma não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma folicular (LF), linfoma de células do manto (LCM), leucemia de células plasmáticas (LCP), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA), caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao referido indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38 ou a composição como definida na reivindicação 39.

53. Método de acordo com a reivindicação 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um ou mais agentes terapêuticos adicionais em combinação com o referido anticorpo ou o referido anticorpo biespecífico.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o um ou mais agentes terapêuticos adicionais é selecionado do grupo que compreende: doxorrubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, clorambucil, bendamustina, vincristina, fludarabina, ibrutinibe e um anticorpo anti-CD 20, tal como rituximabe ou ofatumumabe.

55. Construto de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma ou mais sequências selecionadas do grupo que compreende as SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13a, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20a, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27a, 28, 29, 30, 30a e 31, conforme estabelecido na Tabela 1.

56. Construto de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica o anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38.

57. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais construtos de ácido nucleico como definido na reivindicação 55 ou 56.

58. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor de expressão como definido na reivindicação 57.

59. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula hospedeira recombinante, tal como uma célula procariótica recombinante, célula eucariótica recombinante ou célula hospedeira microbiana recombinante.

60. Anticorpo anti-idiotípico, caracterizado pelo fato de que se liga ao anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38.

61. Método *in vitro* para detectar a presença de um antígeno CD37 humano ou uma célula que expressa CD37 humano em uma amostra, o referido método caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) contatar a amostra com o anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou com o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou o anticorpo biespecífico e CD37; e

(ii) detectar a formação de um complexo.

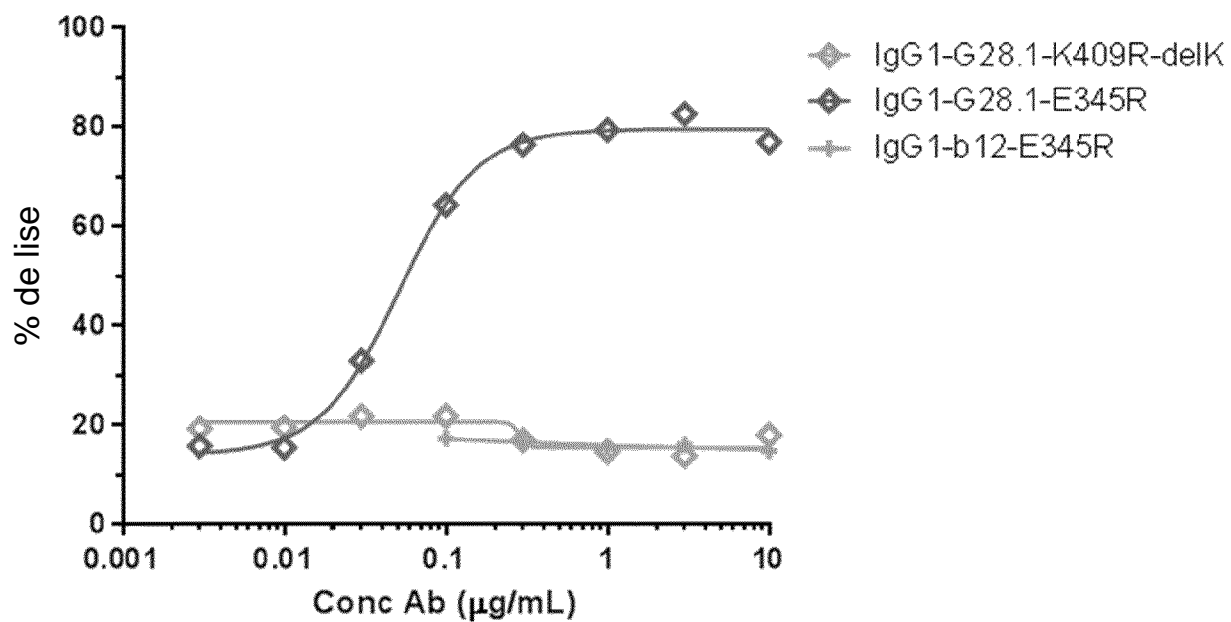
62. Método *in vivo* para detectar a presença de um antígeno CD37 humano ou uma célula que expressa CD37 humano em um indivíduo, o referido método caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) administrar o anticorpo biespecífico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou o anticorpo biespecífico e CD37; e

(ii) detectar o complexo formado.

Figura 1

A



B

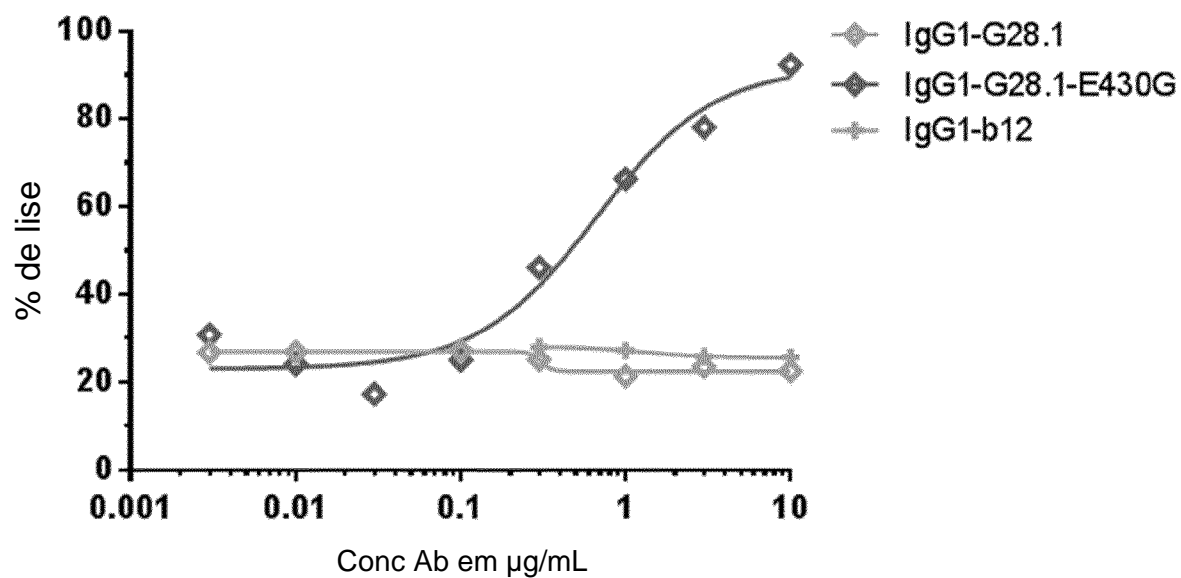


Figura 2

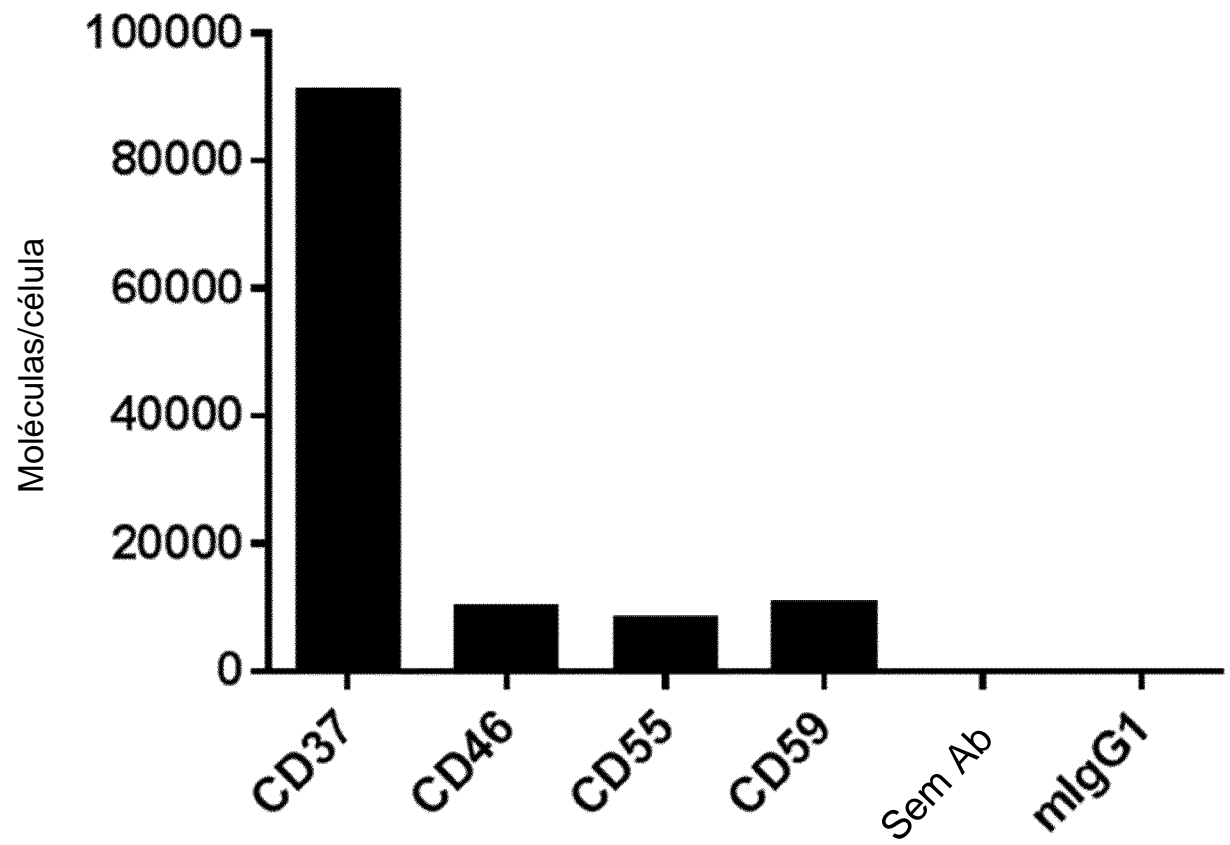


Figura 3

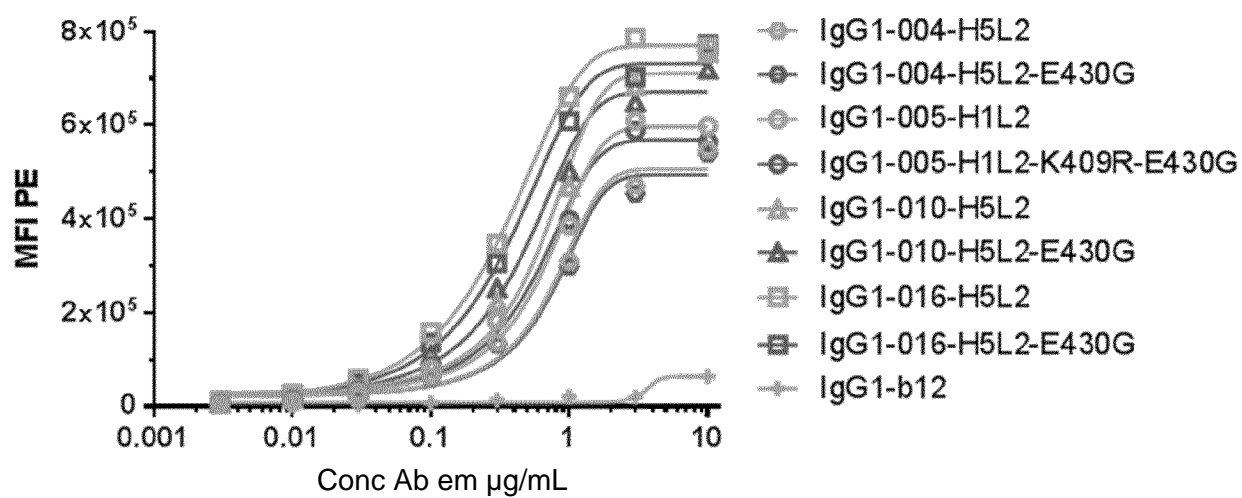


Figura 4

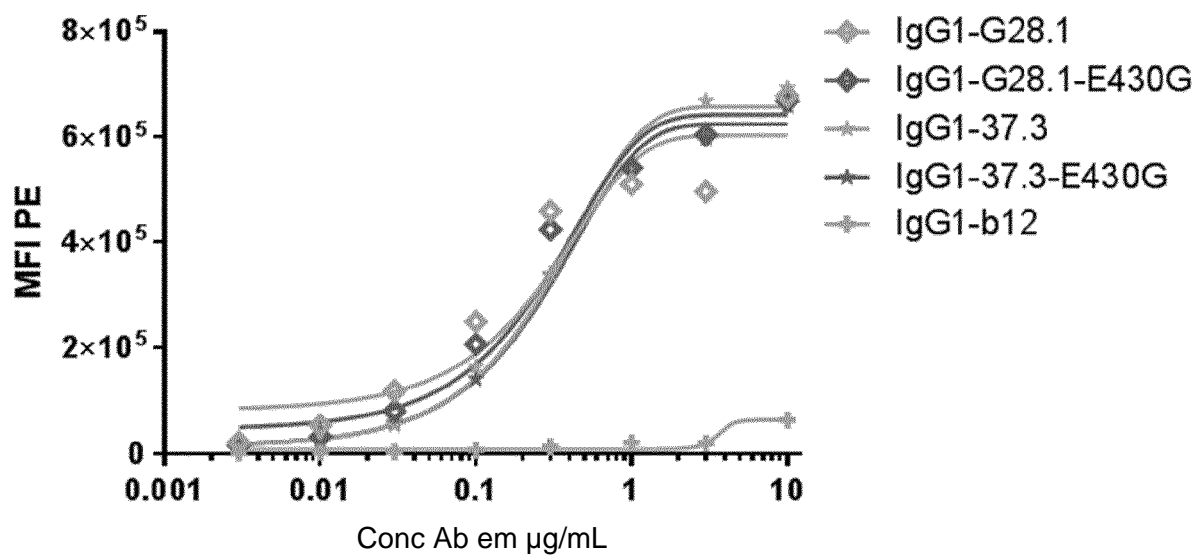


Figura 5

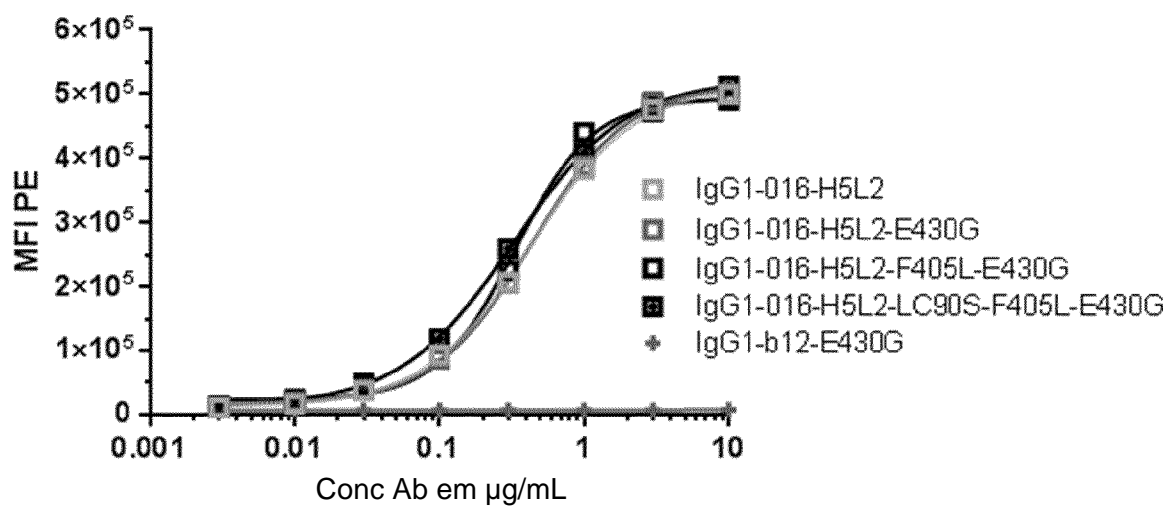


Figura 6

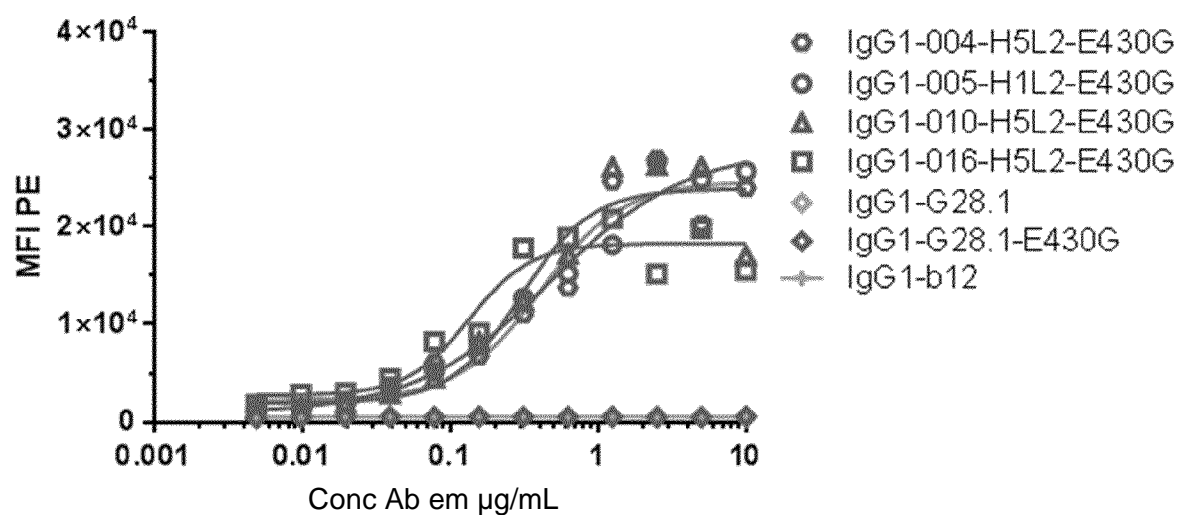
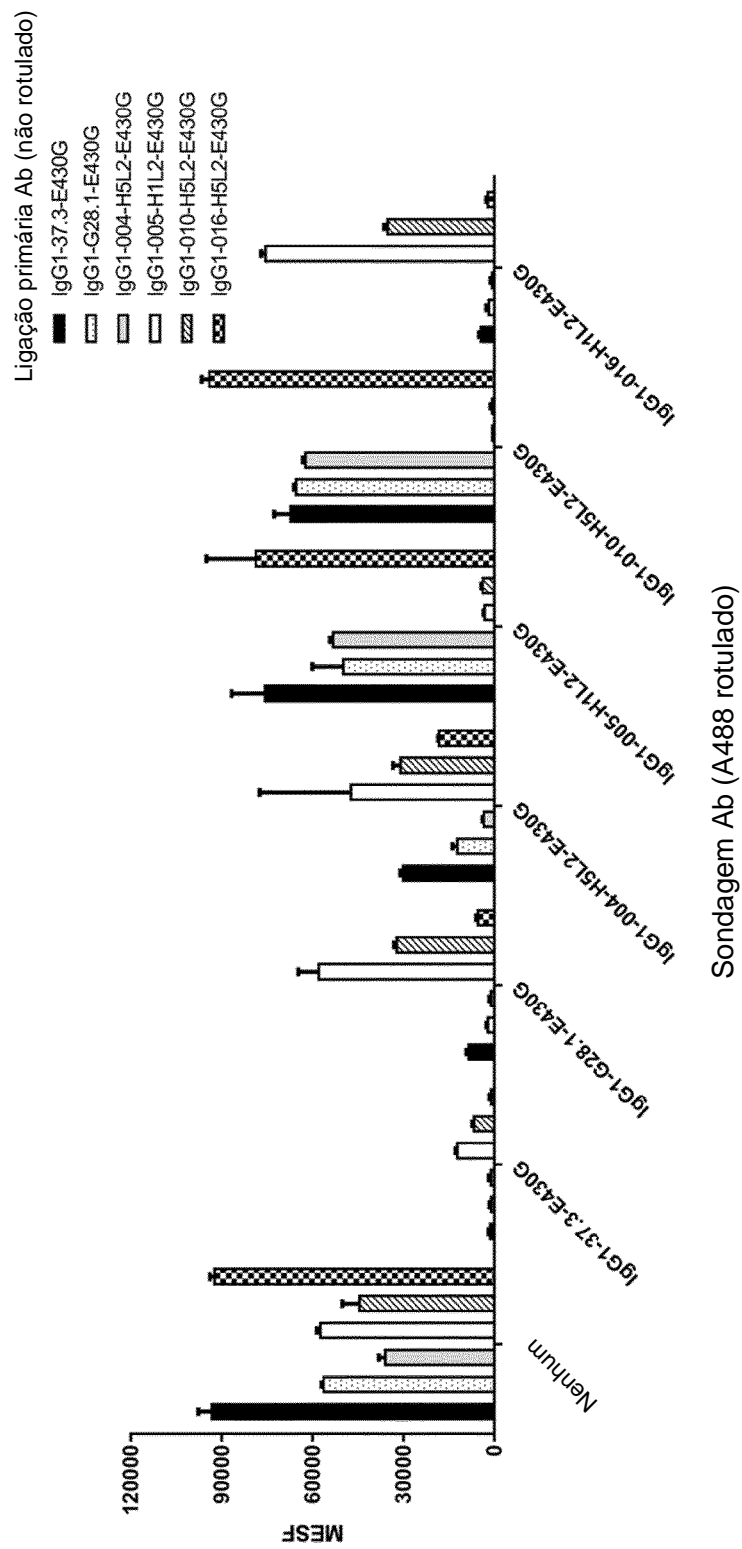
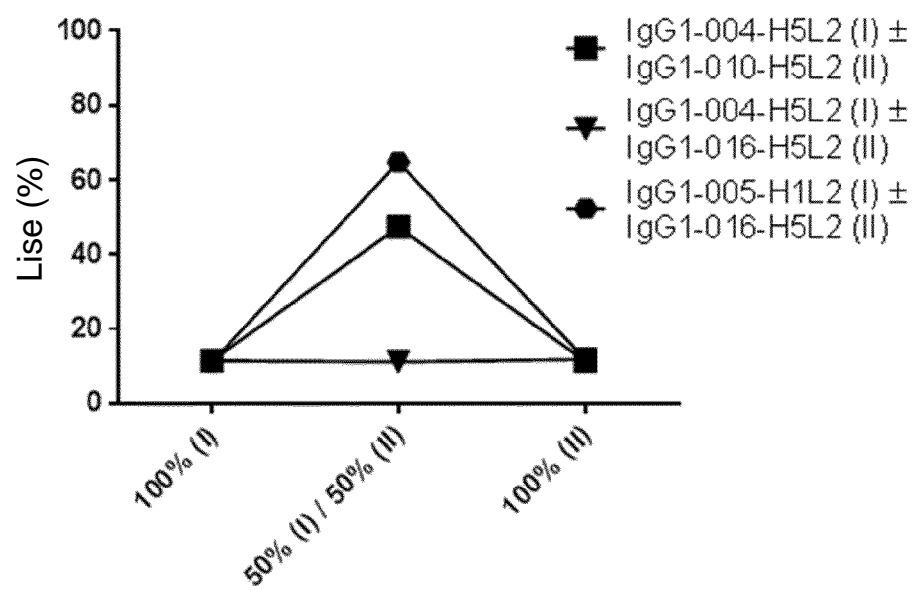


Figura 7

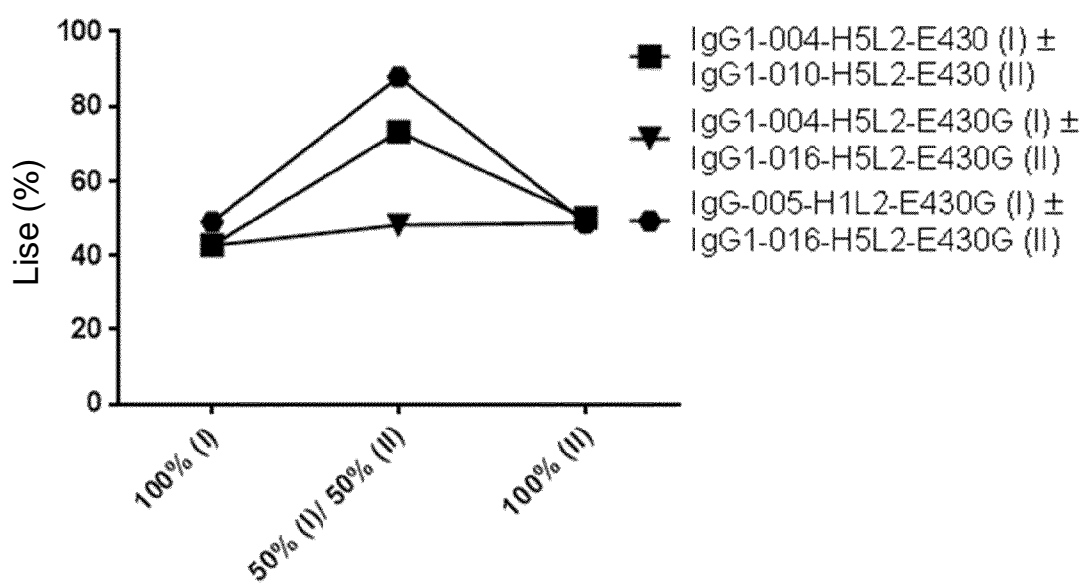
A



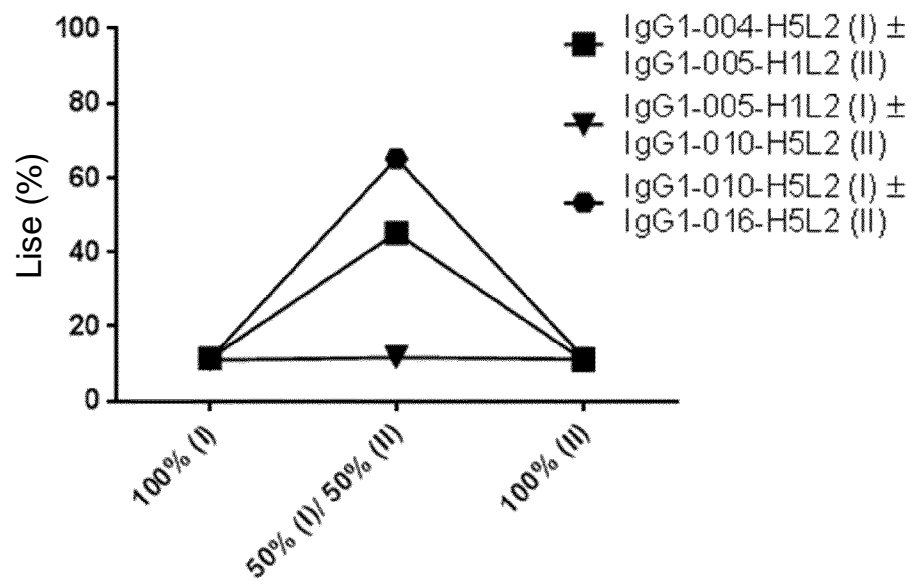
B



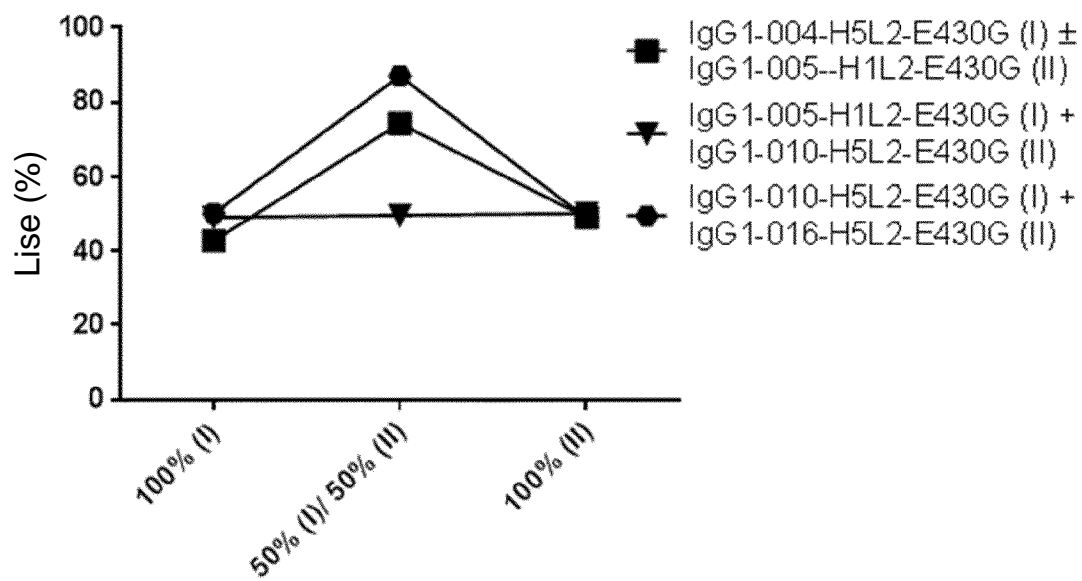
C



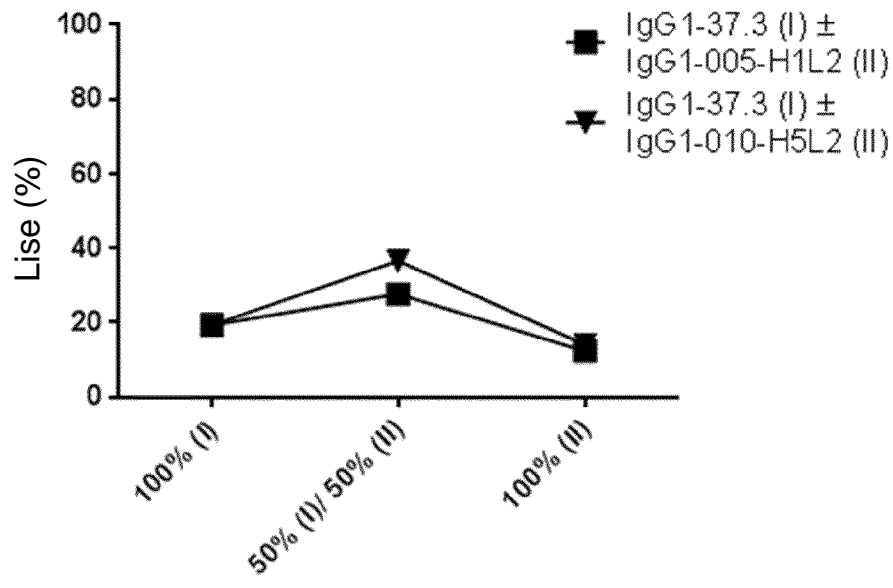
D



E



F



G

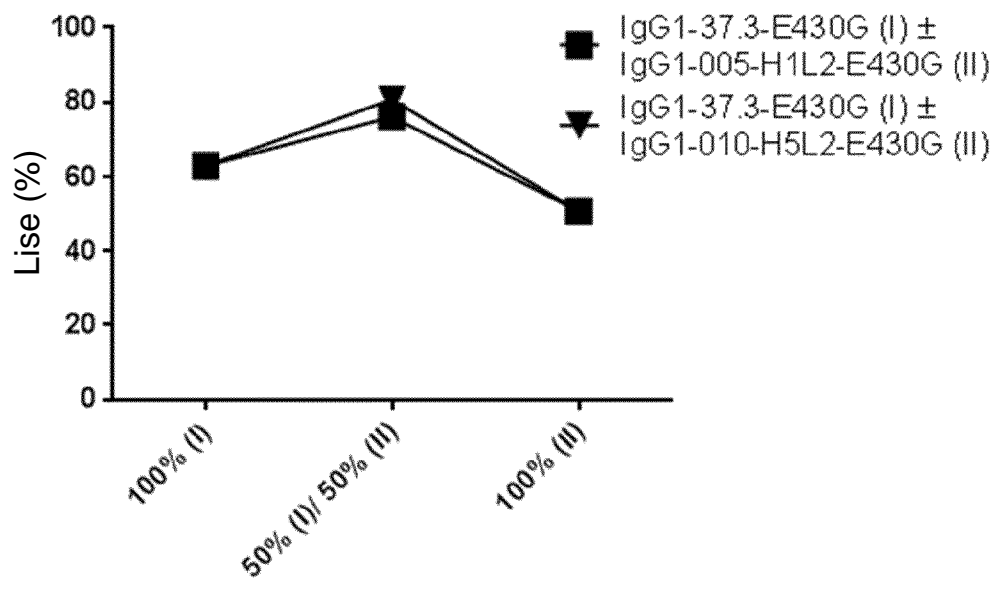


Figura 8

Ligação primária Ab (não rotulado)	IgG1-37.3- E430G	IgG1-G28.1- E430G	IgG1-004- H5L2-E430G	IgG1-005- H1L2-E430G	IgG1-010- H5L2-E430G	IgG1-016- H5L2-E430G
Sondagem Ab (rotulado)						
IgG1-37.3-E430G						
IgG1-G28.1-E430G						
IgG1-004-H5L2-E430G						
IgG1-005-H1L2-E430G						
IgG1-010-H5L2-E430G						
IgG1-016-H5L2-E430G						

Figura 9

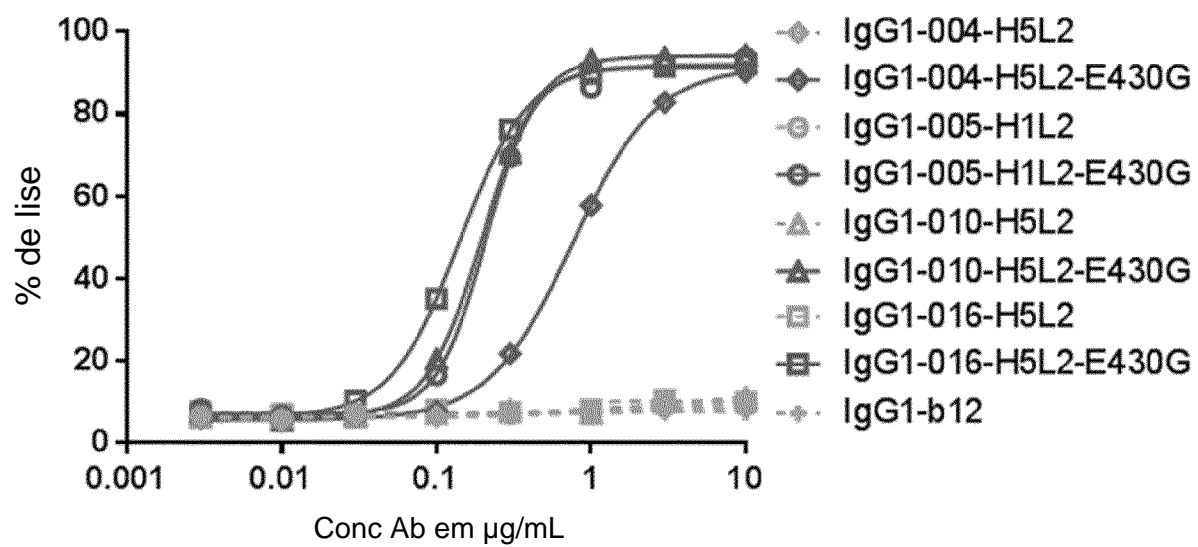
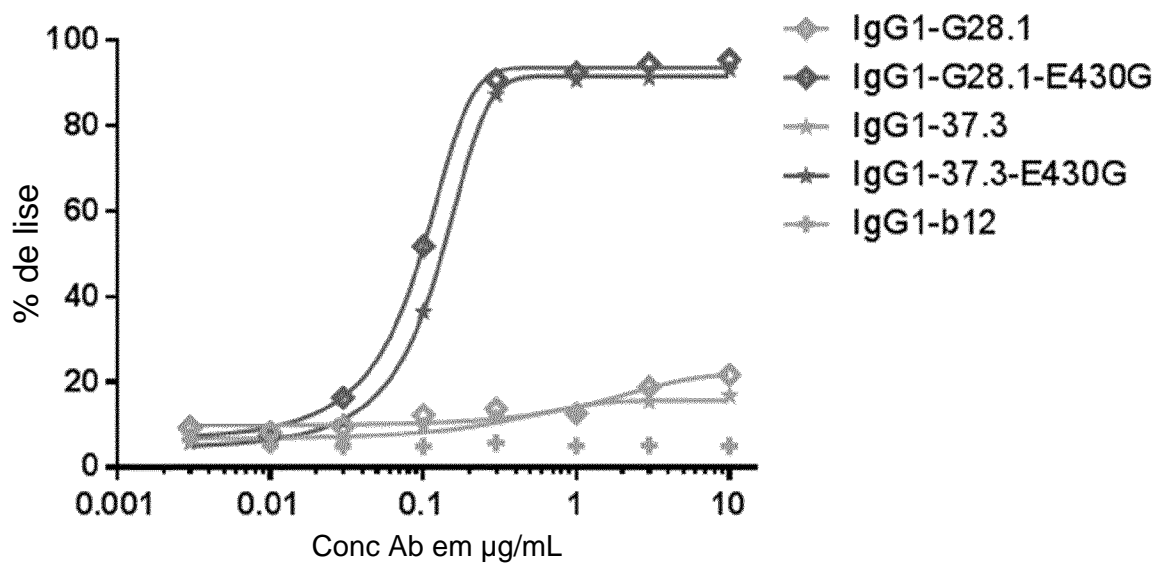
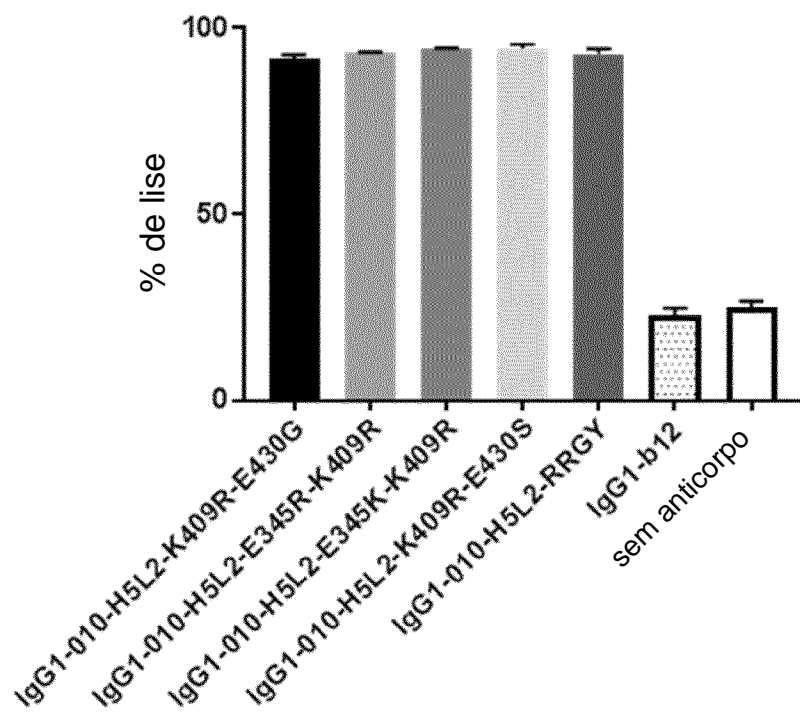


Figura 10

A



B



c

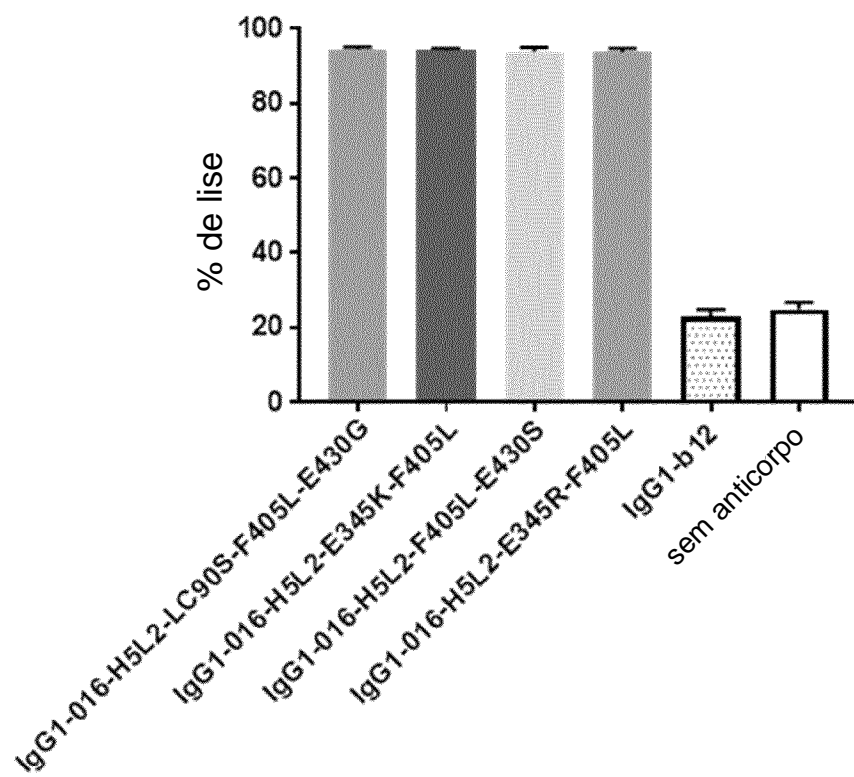


Figura 11

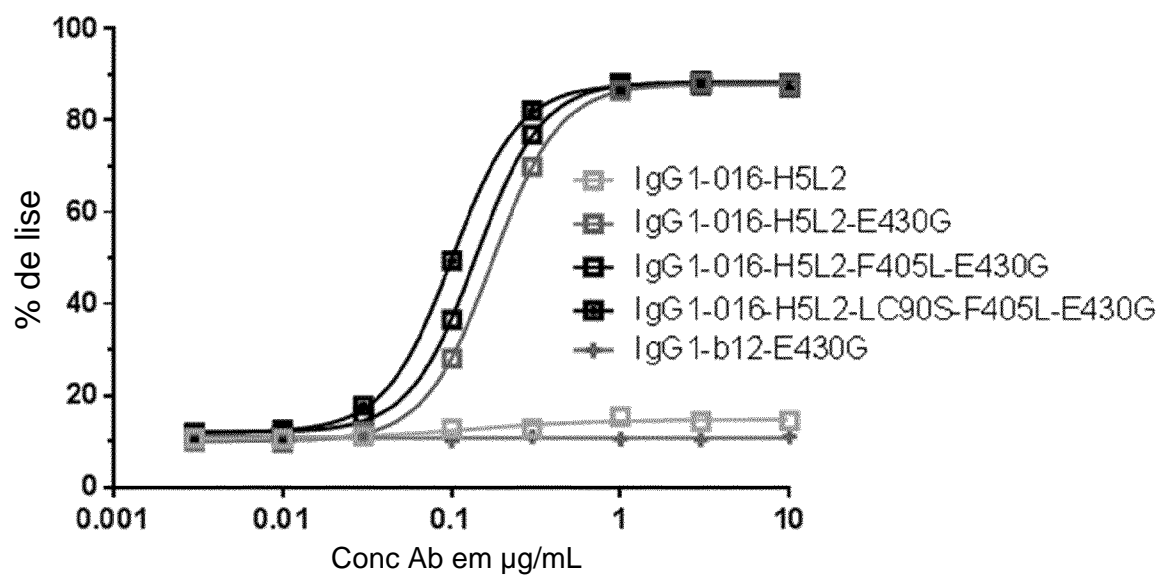
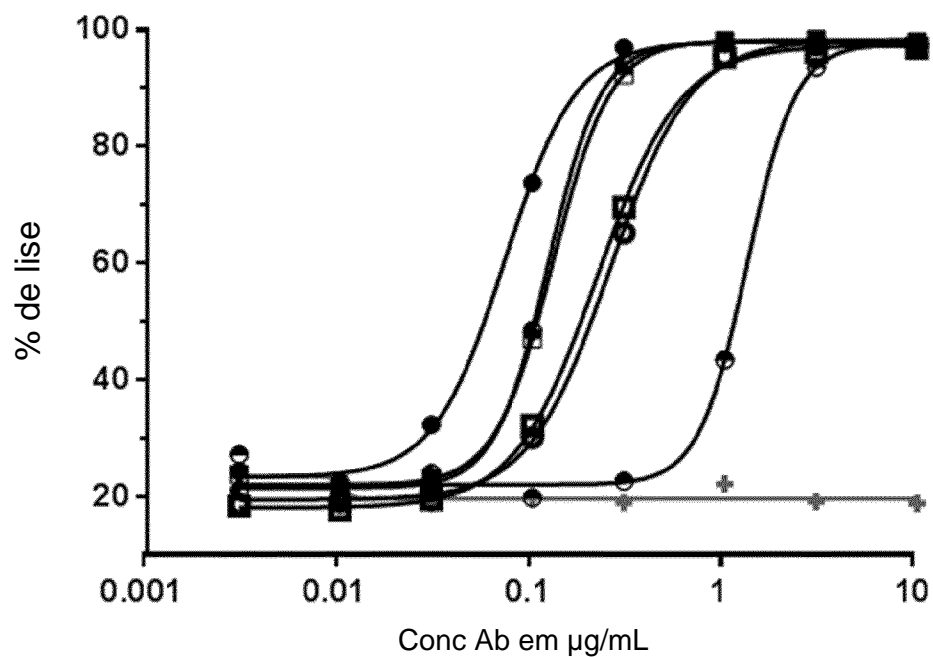


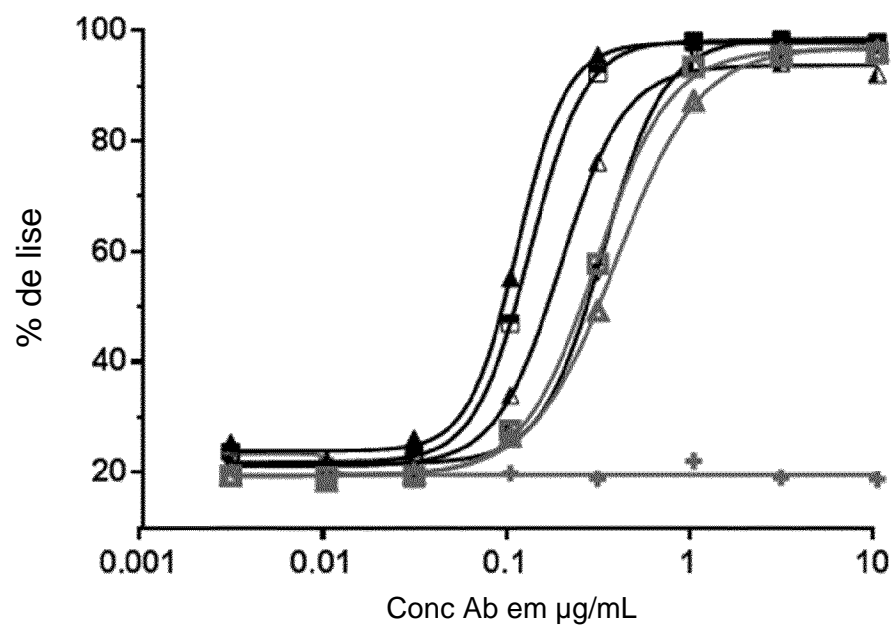
Figura 12

A



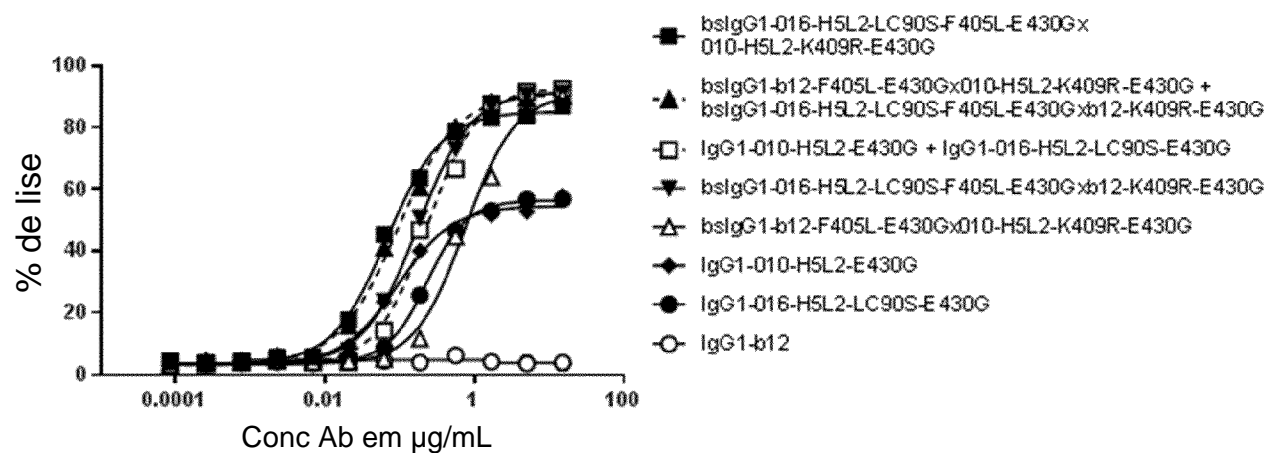
- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G
- IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G + IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- bsIgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bsIgG 1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bsIgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- ✦ IgG 1-b12-E430G

B

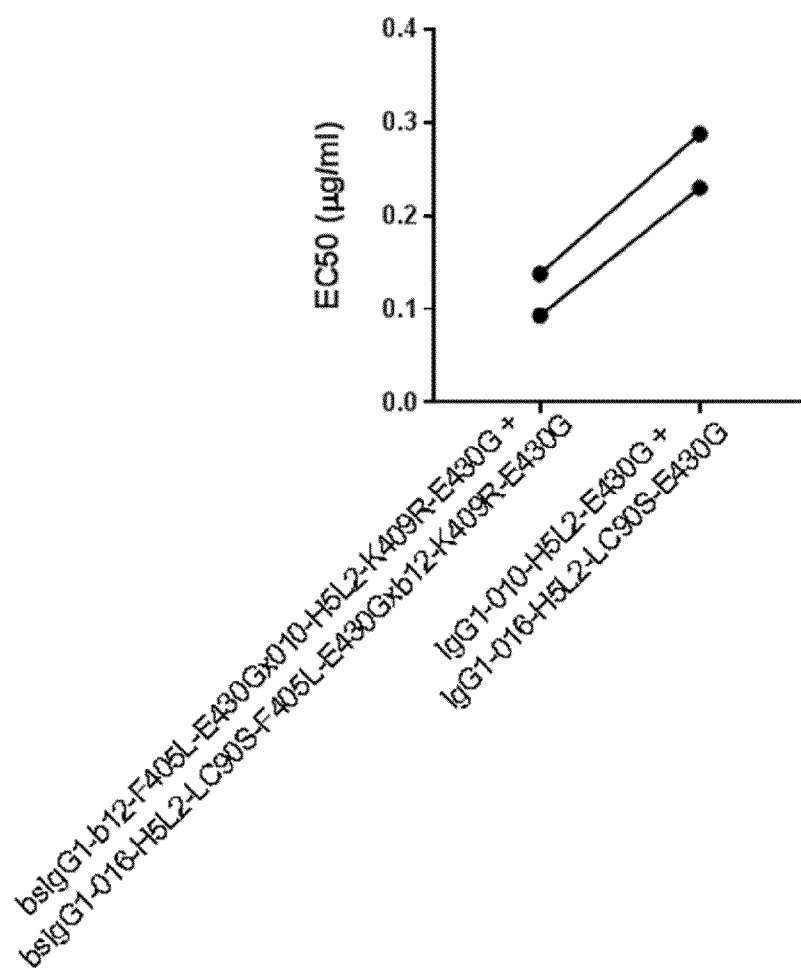


- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G
- IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- ▼ bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- + IgG1-b12-E430G

C



D



E

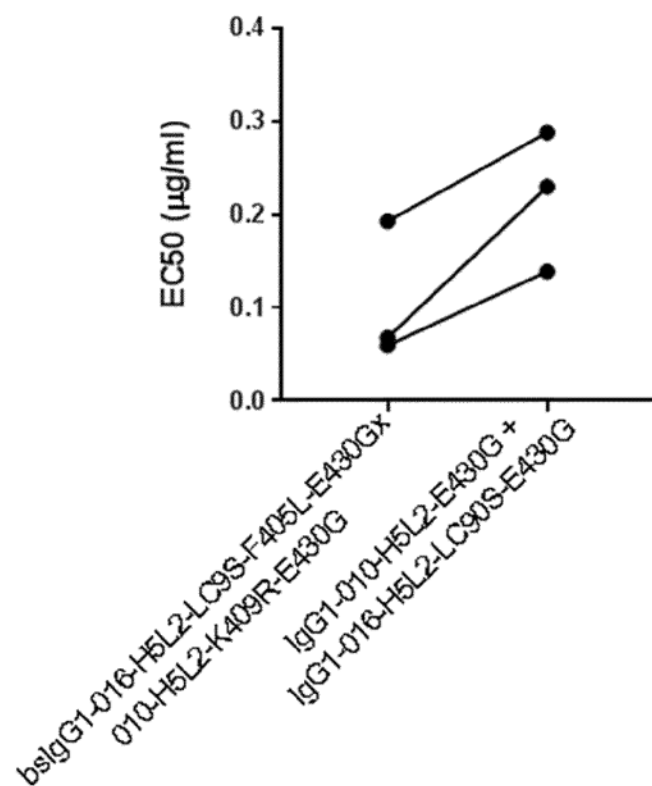
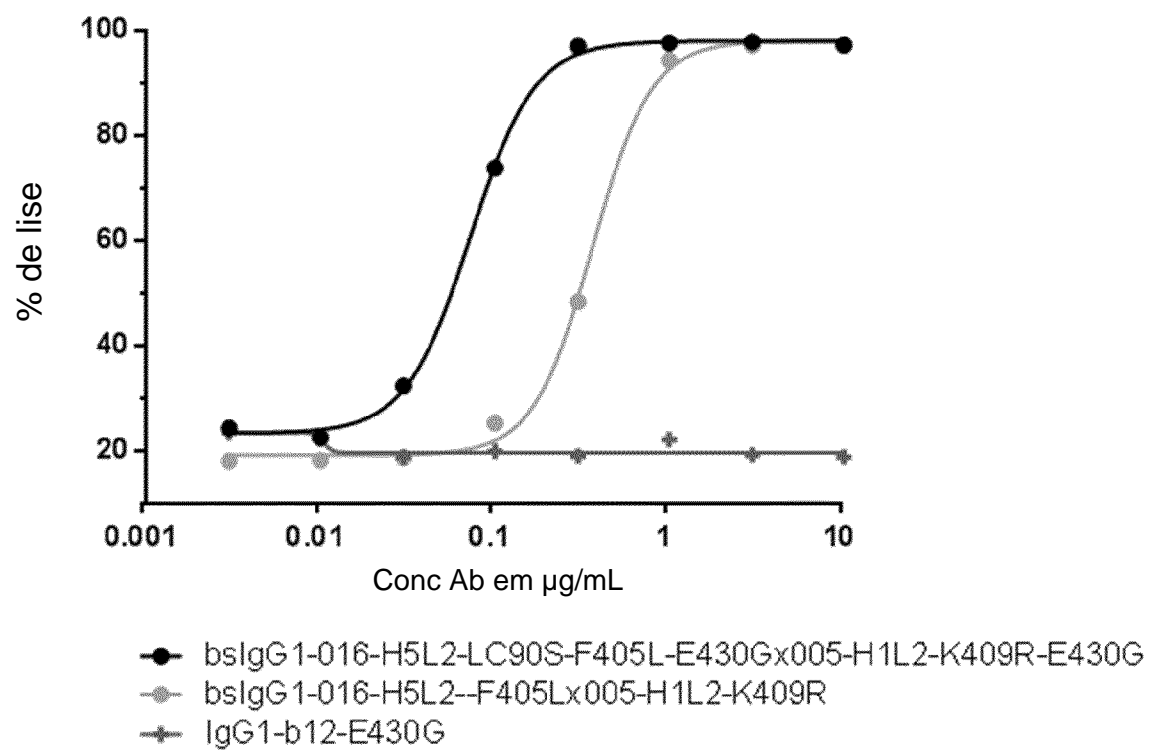


Figura 13

A



B

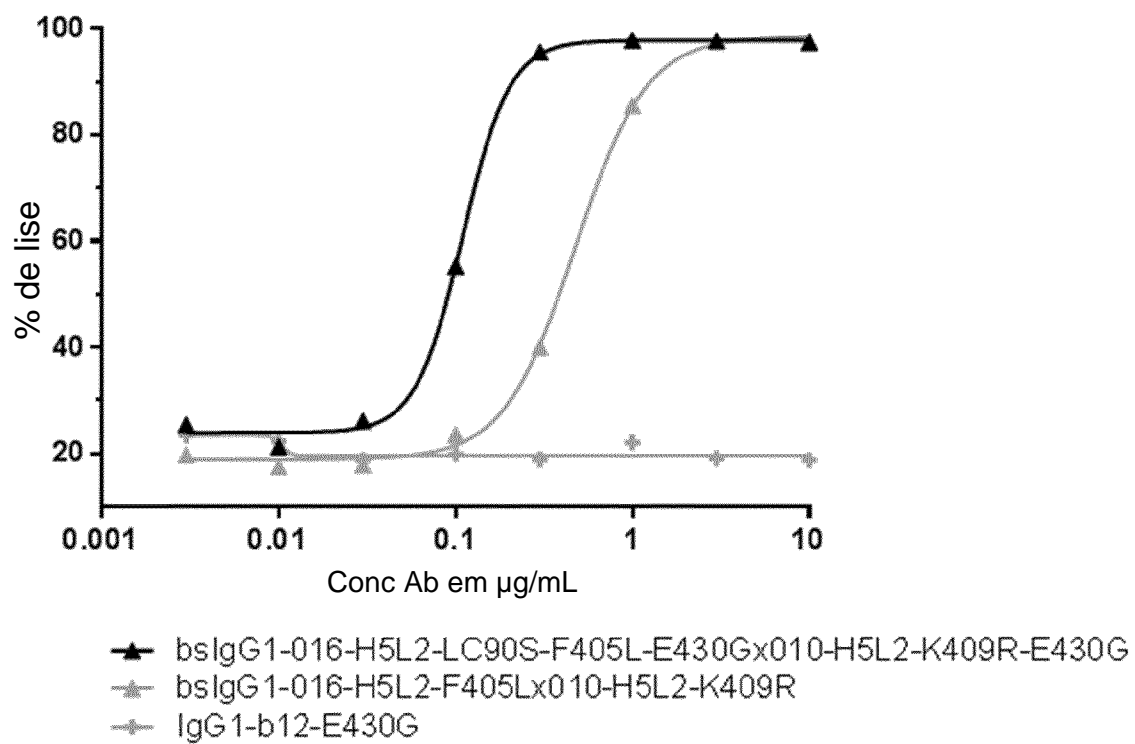
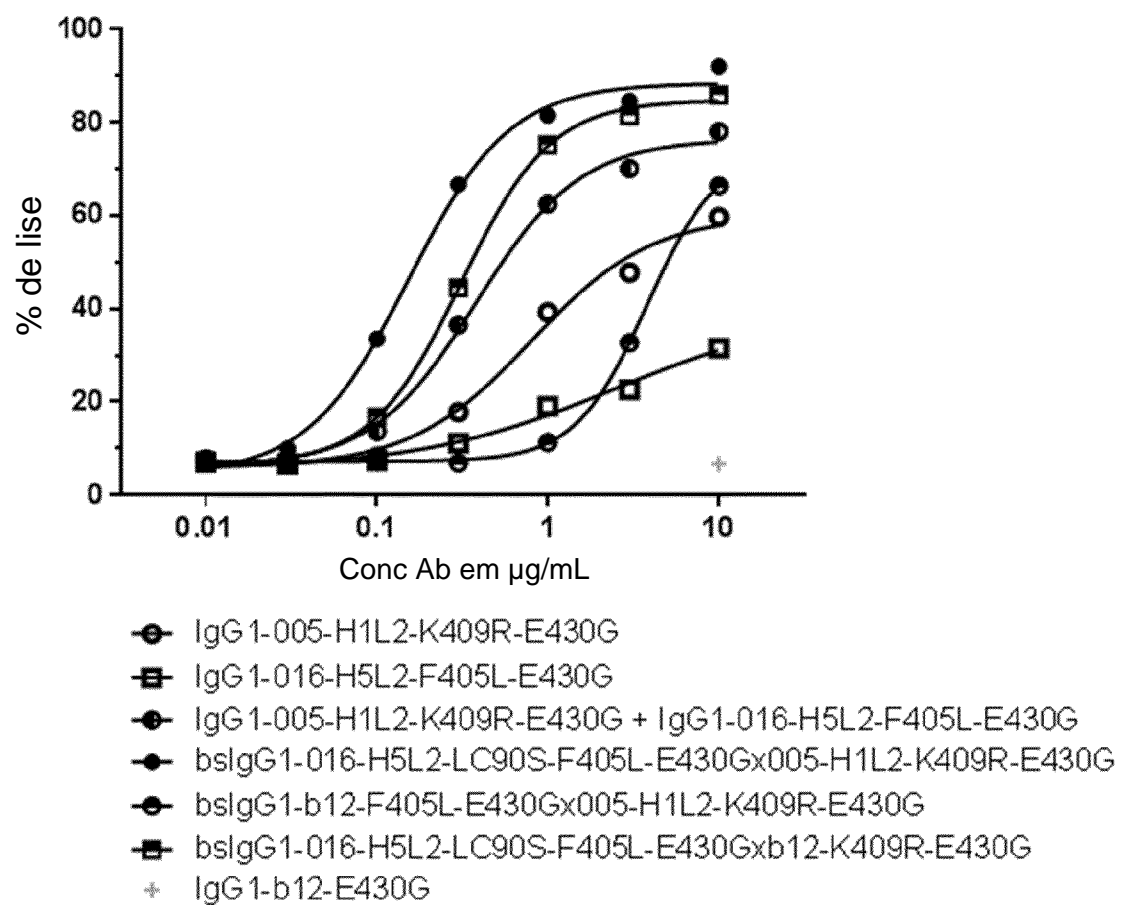
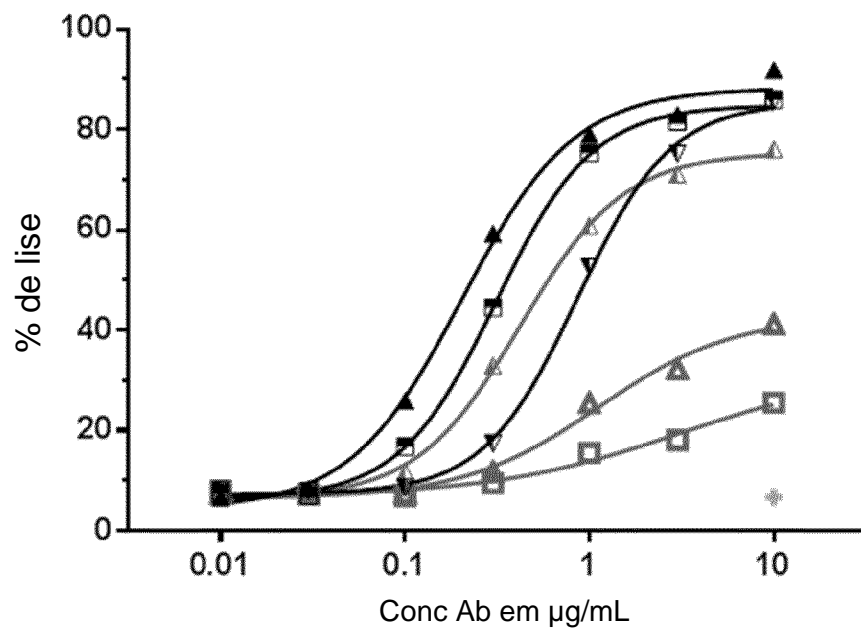


Figura 14

A



B



- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G
- IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- ▼ bslgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- ✱ IgG1-b12

Figura 15

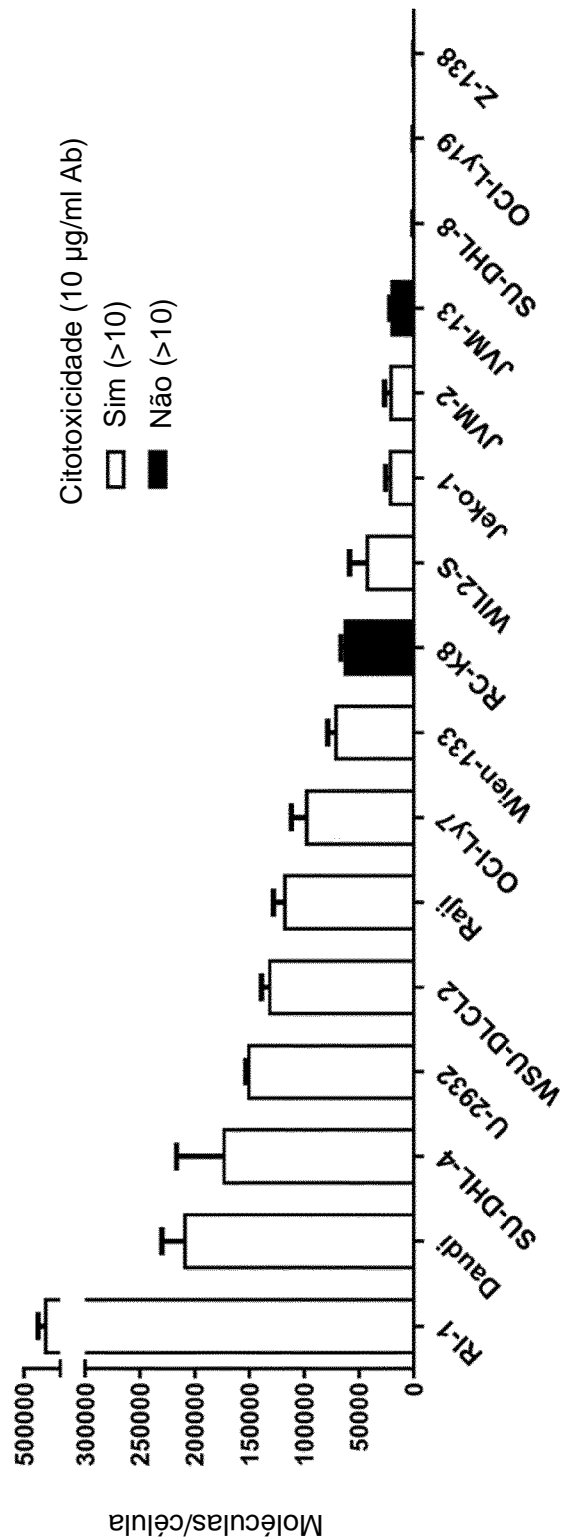
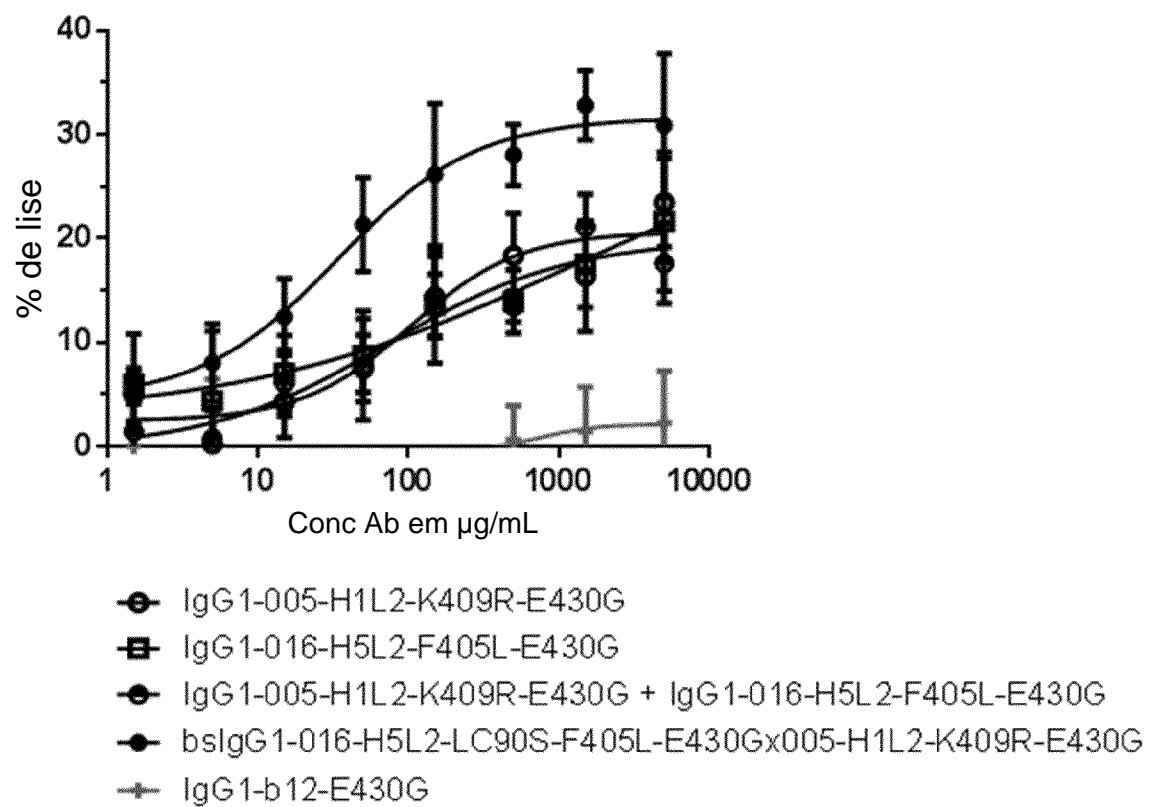
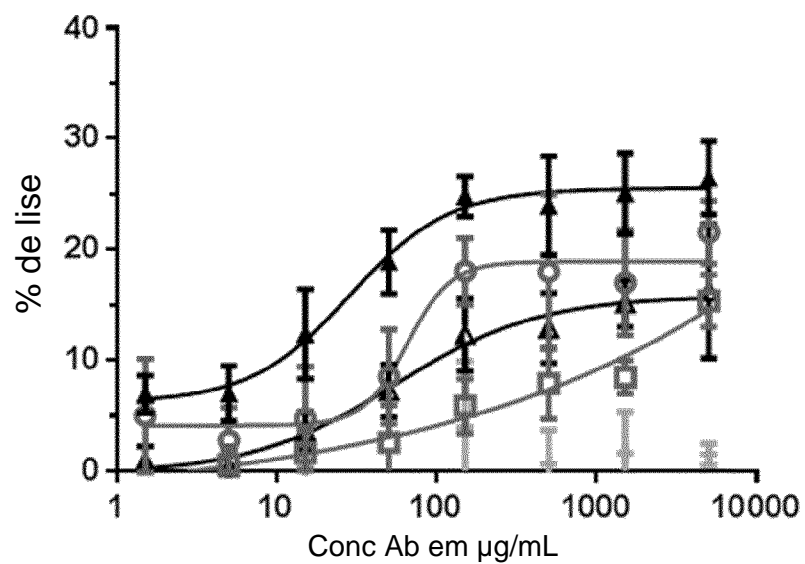


Figura 16

A



B



- IgG1-010-H5L2-E430G
- IgG1-016-H5L2-E430G
- △ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- * IgG1-b12-E430G

Figura 17

c

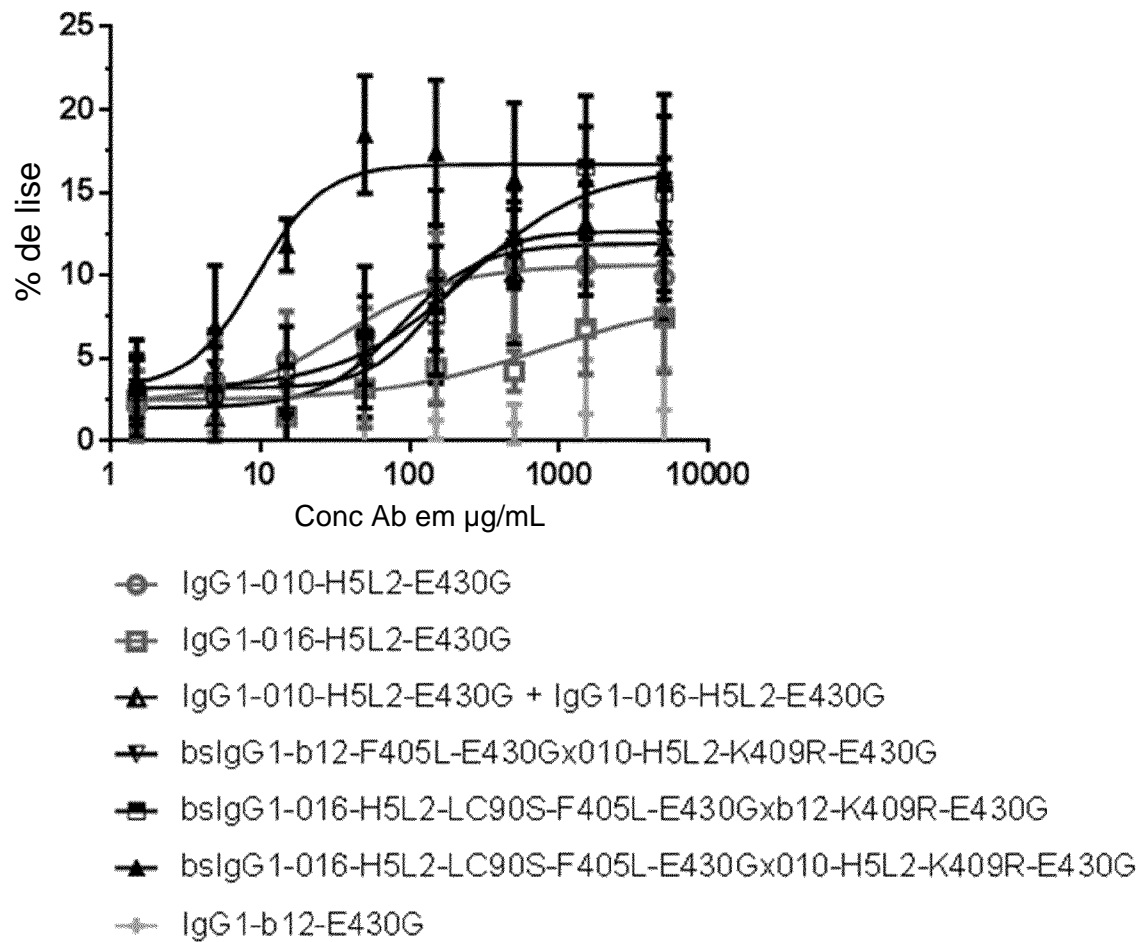
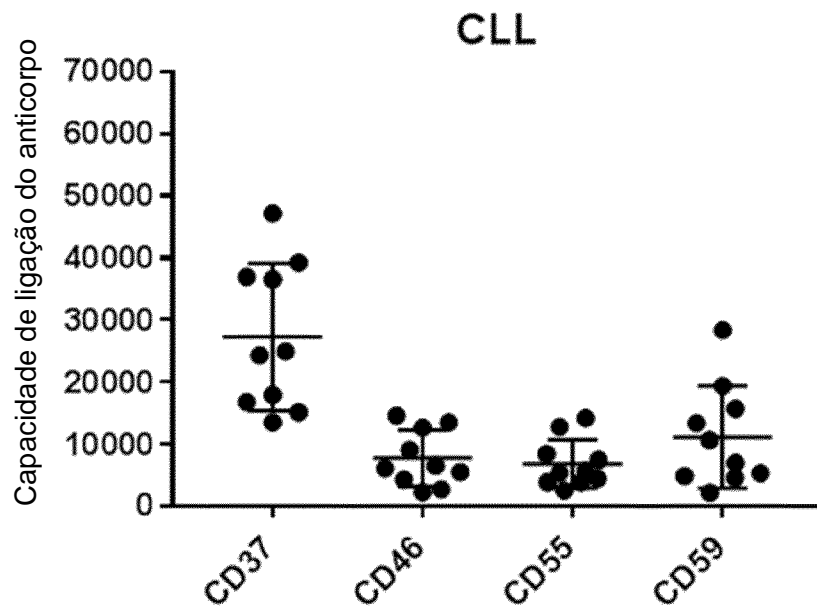
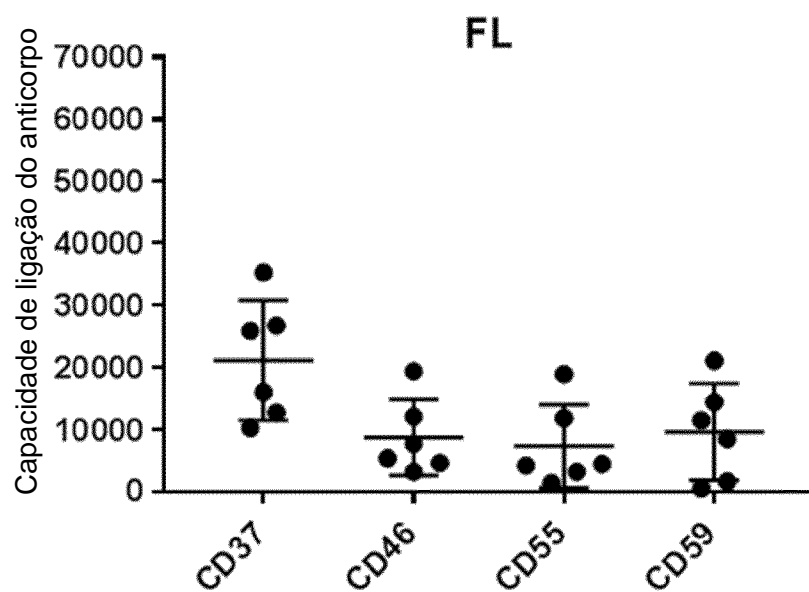


Figura 17

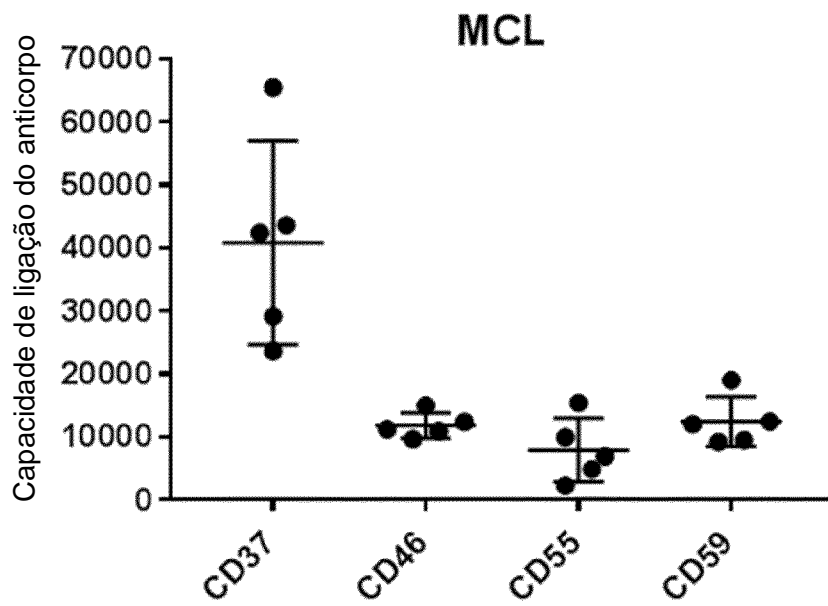
A



B



C



D

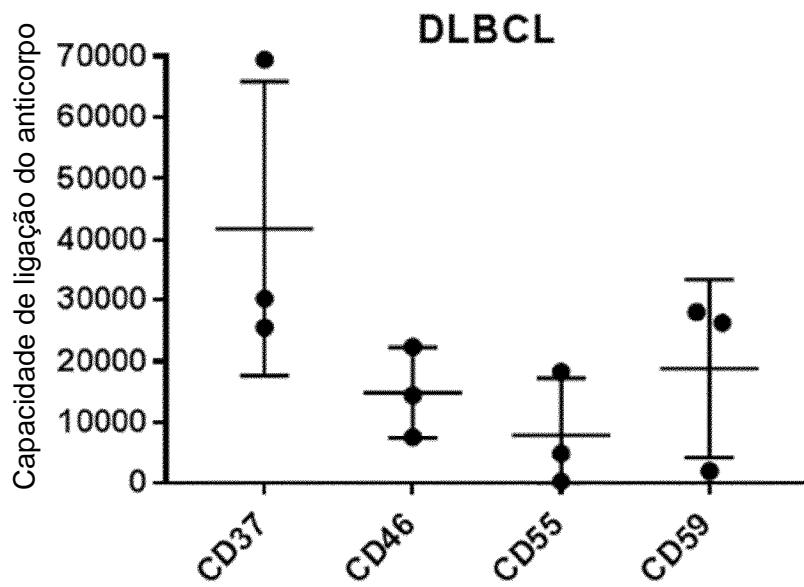
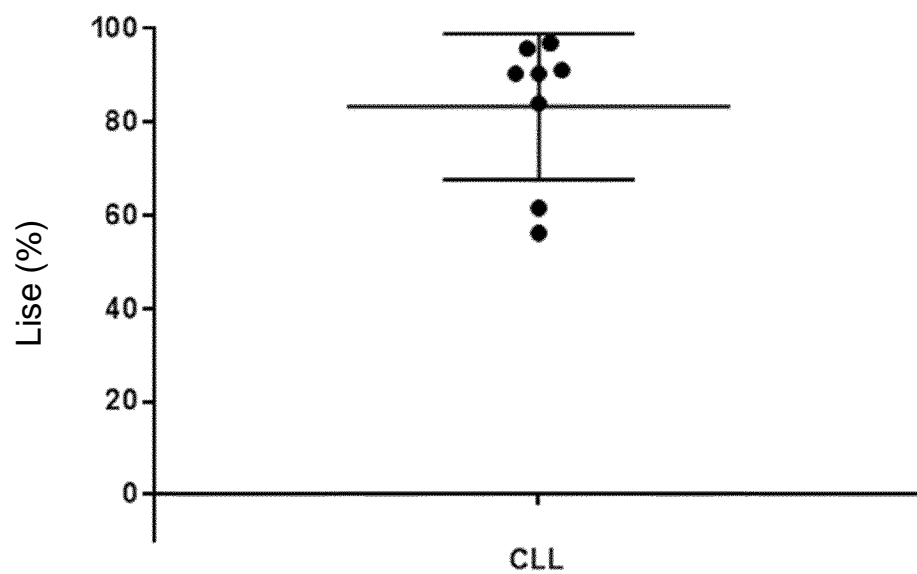
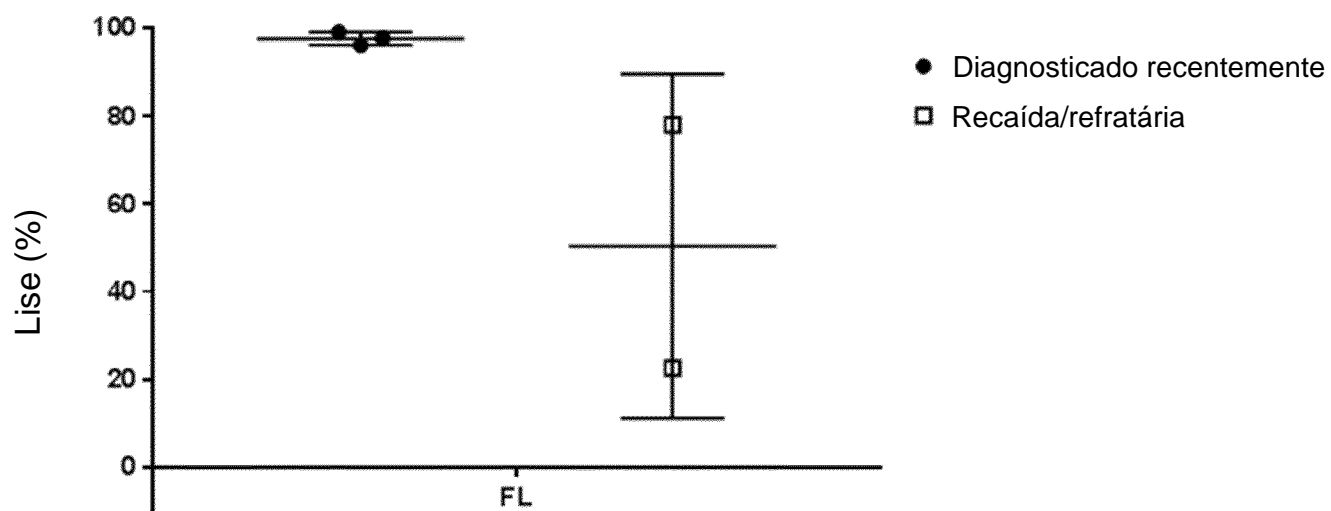


Figura 18

A



B



c

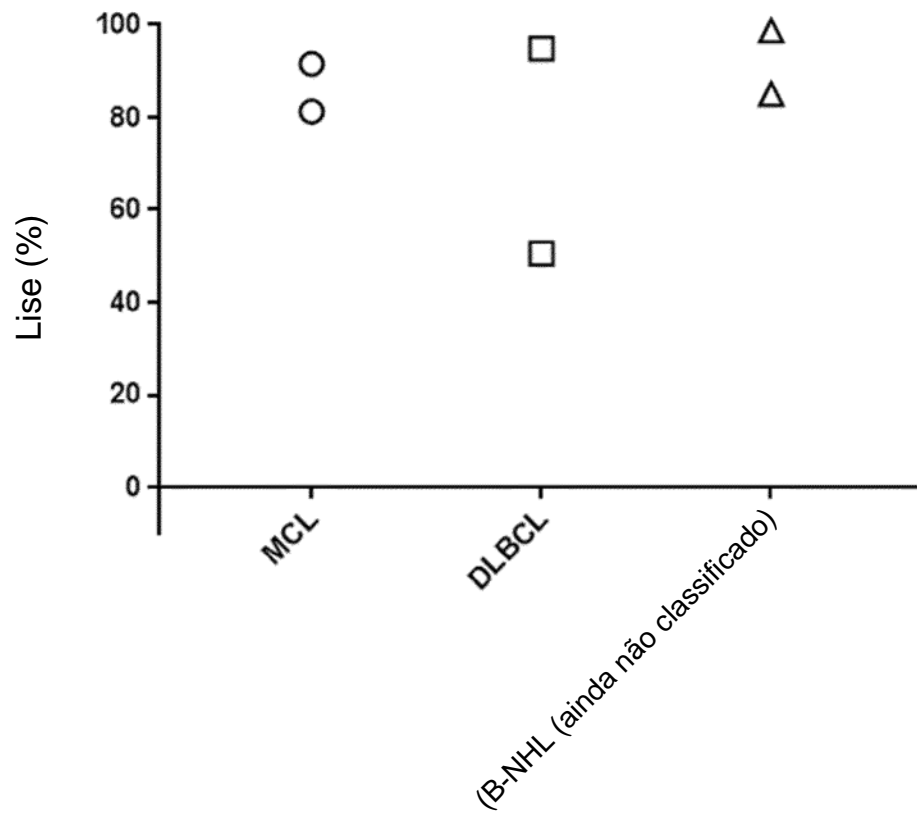
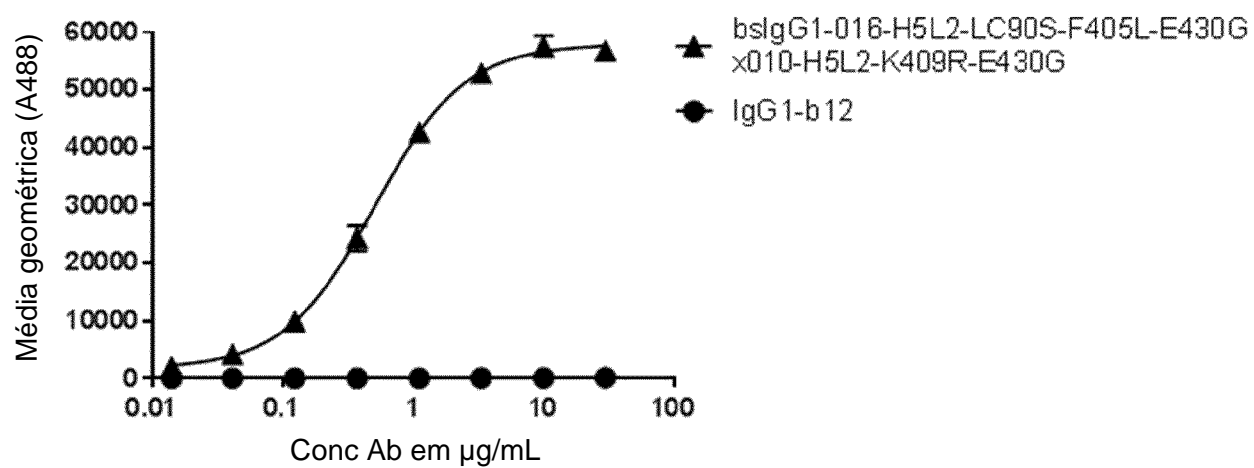


Figura 19

A



B

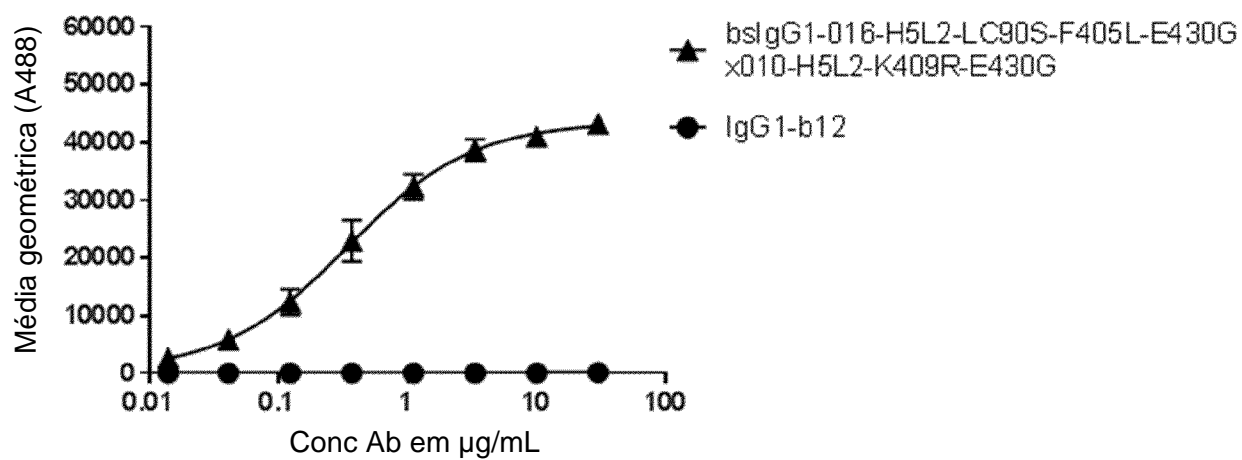
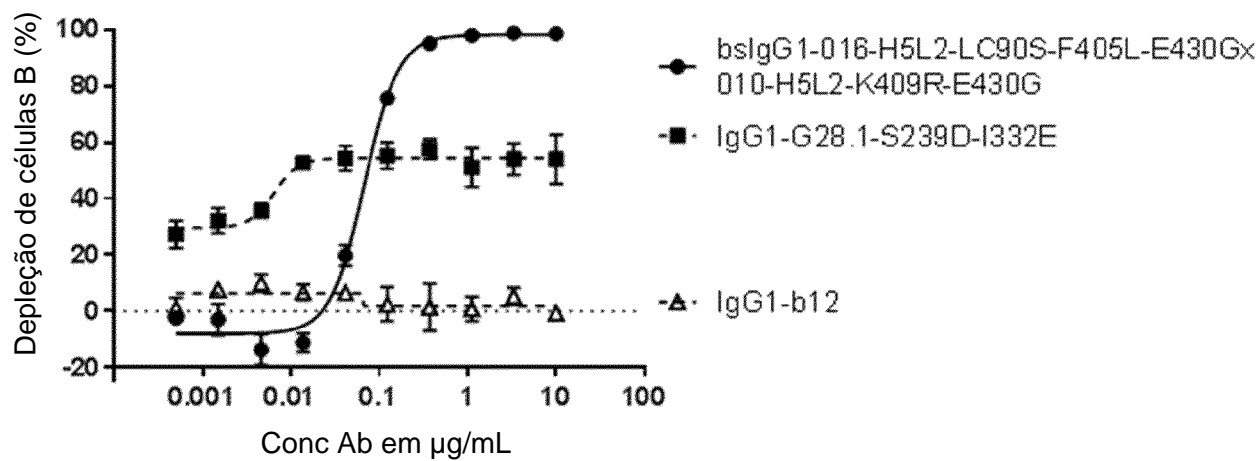


Figura 20

A



B

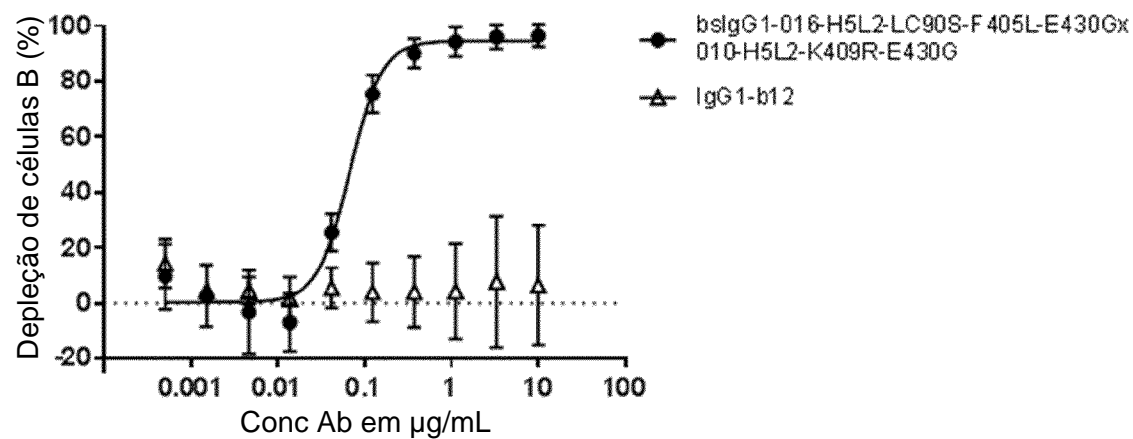
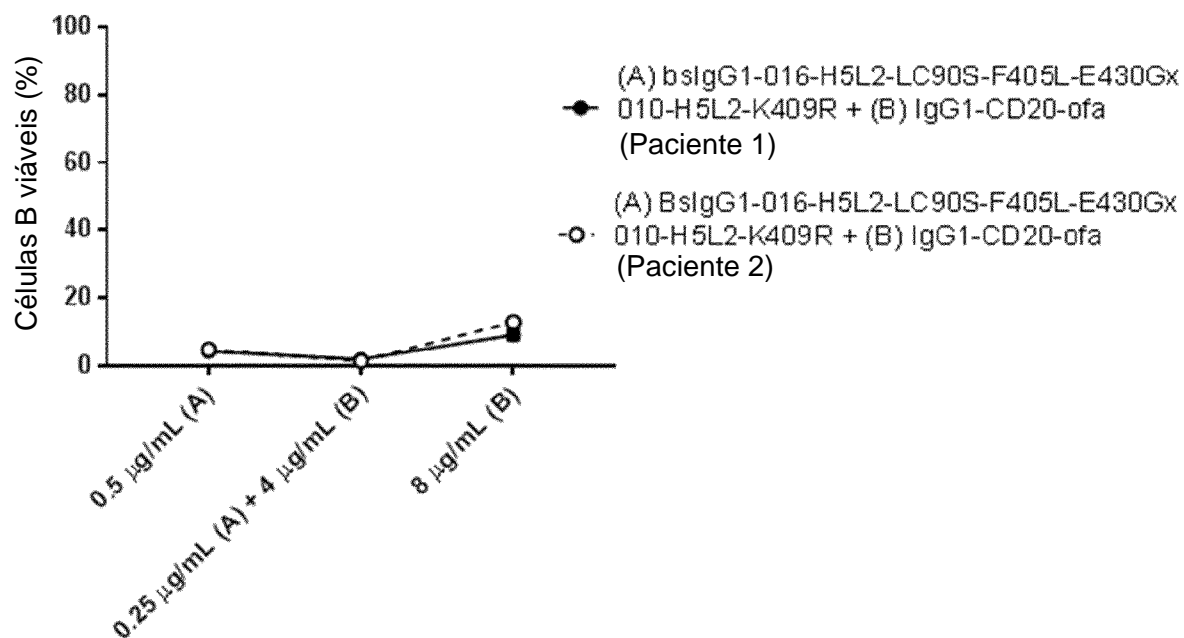
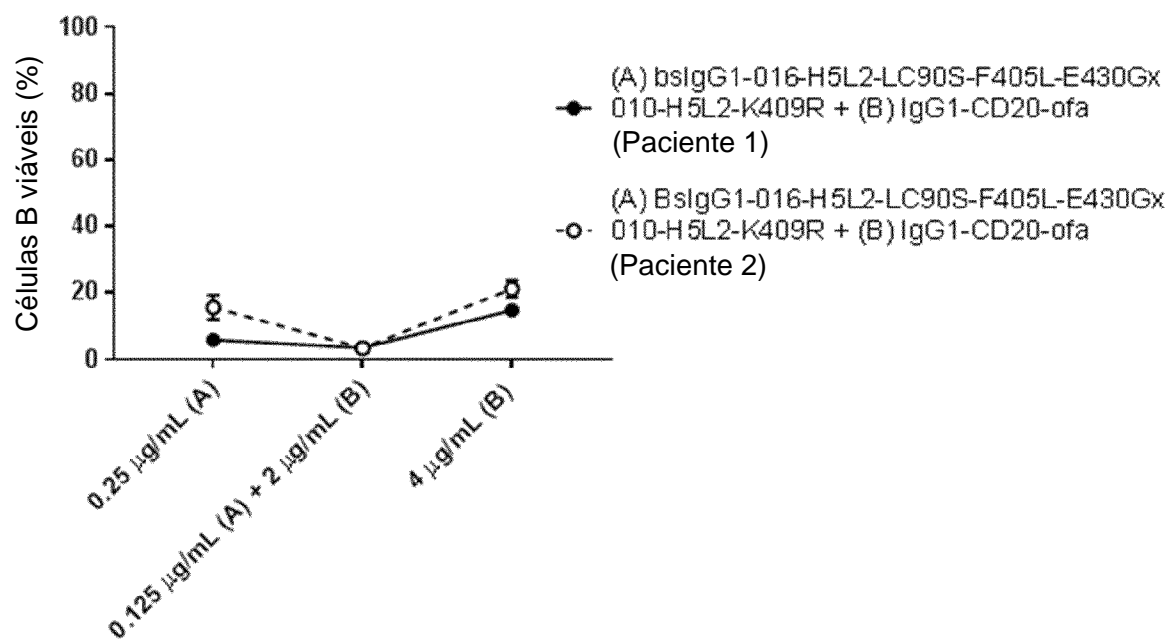


Figura 21

A



B



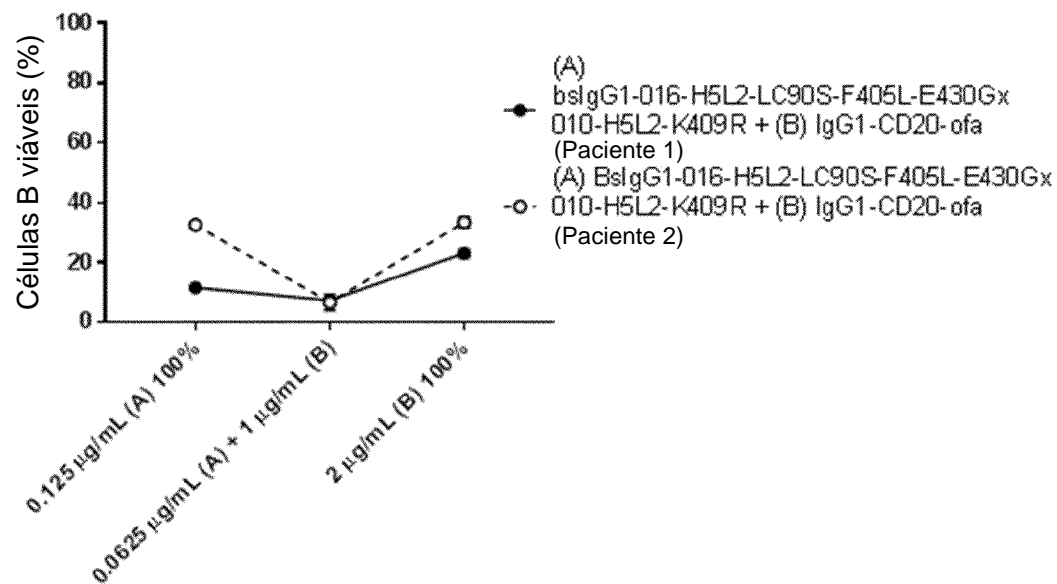
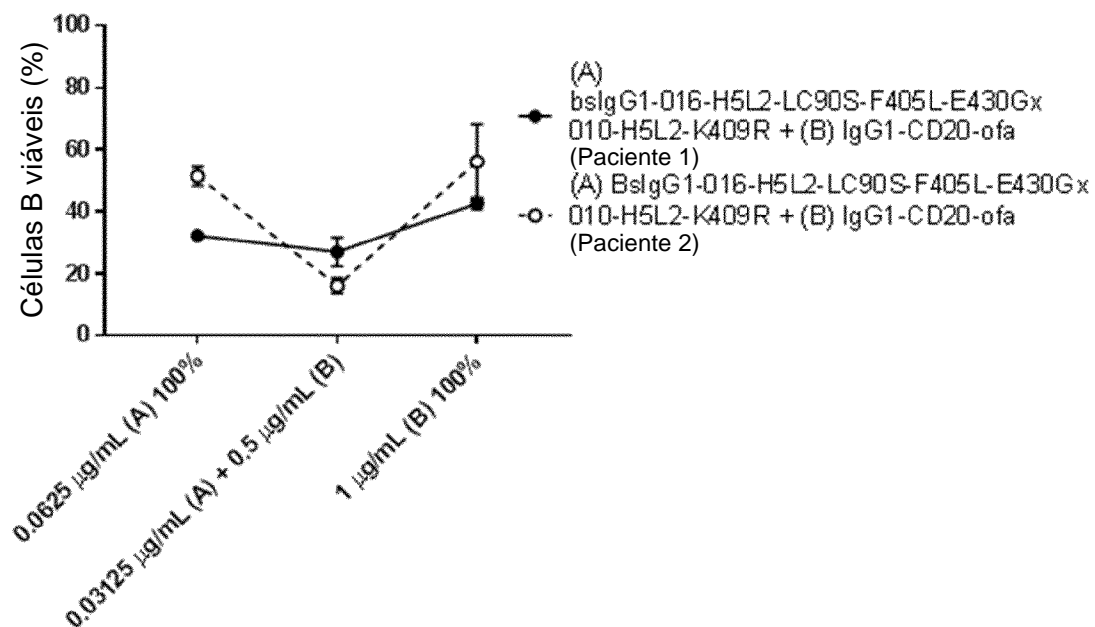
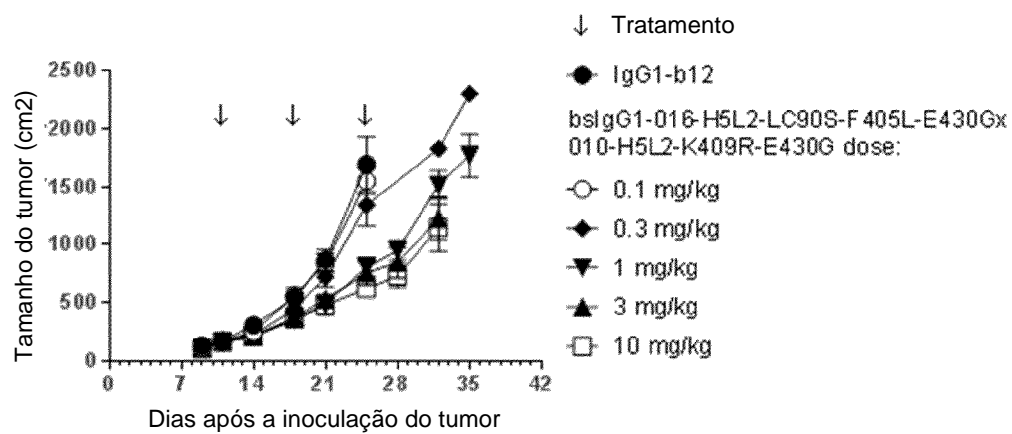
C**D**

Figura 22

A



B

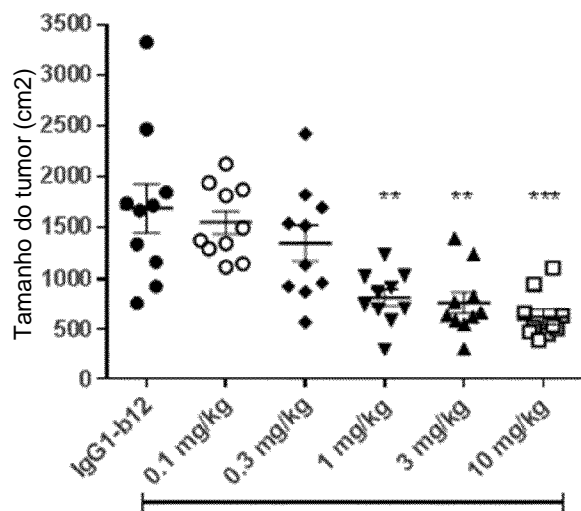


Figura 23

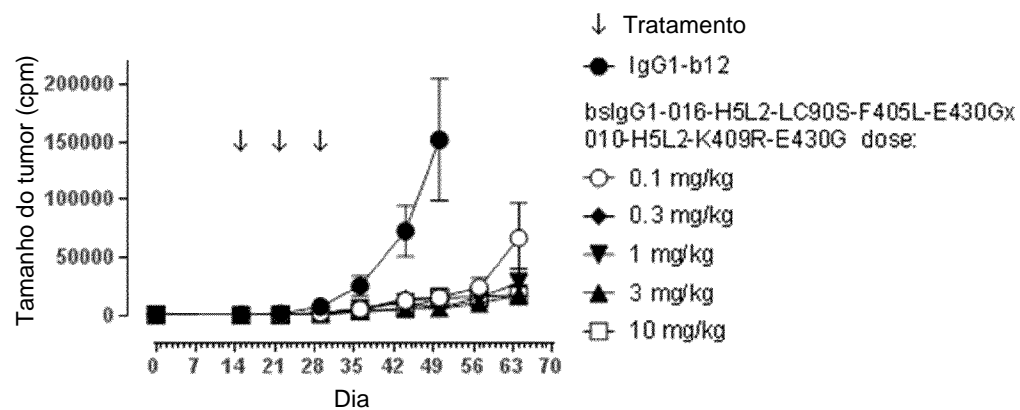
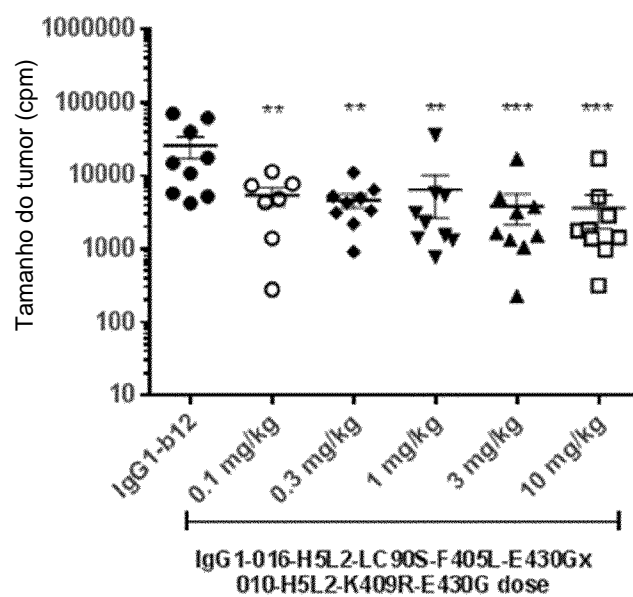
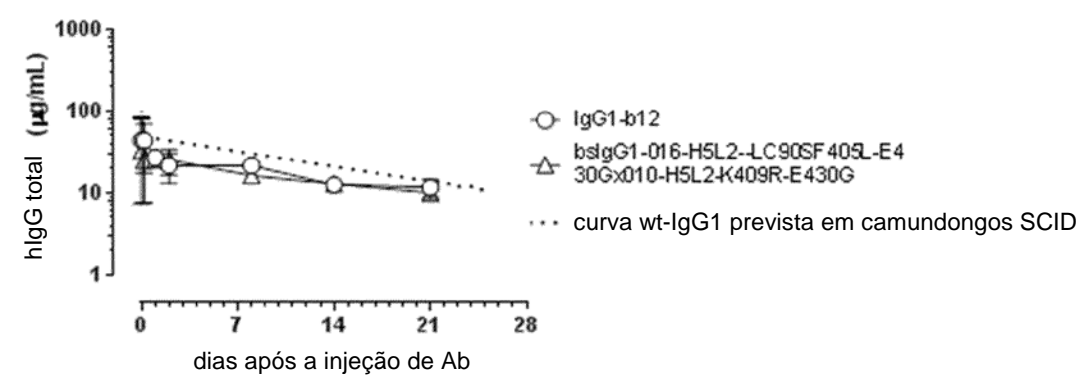
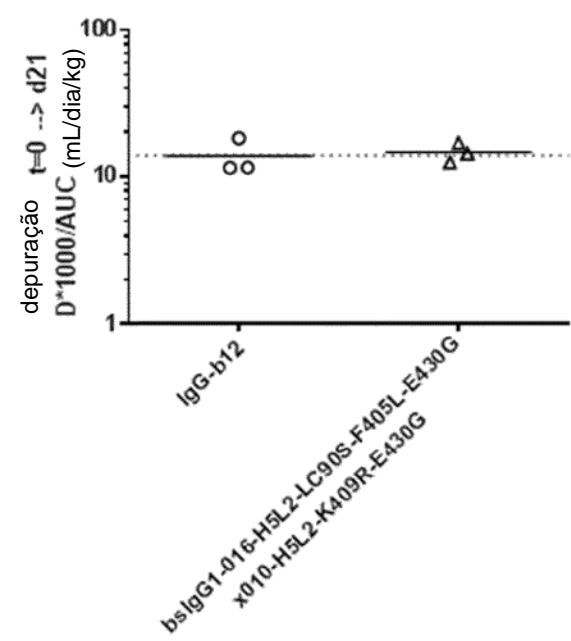
A**B**

Figura 24

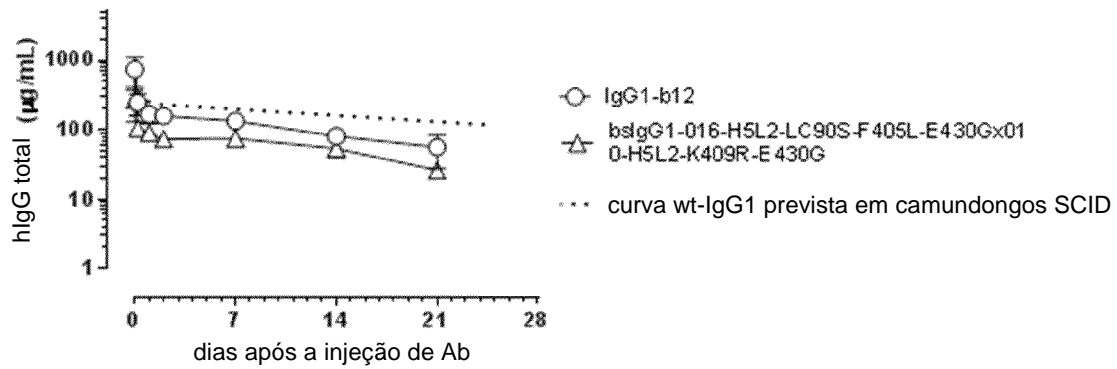
A



B



C



D

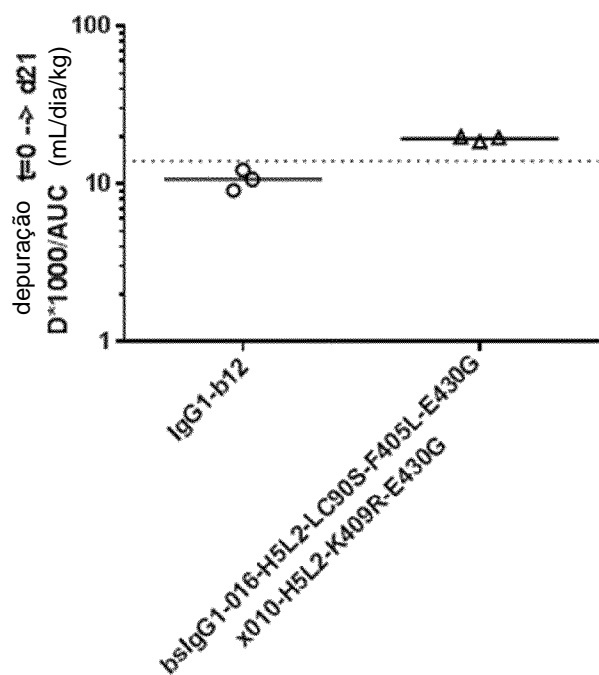


Figura 25

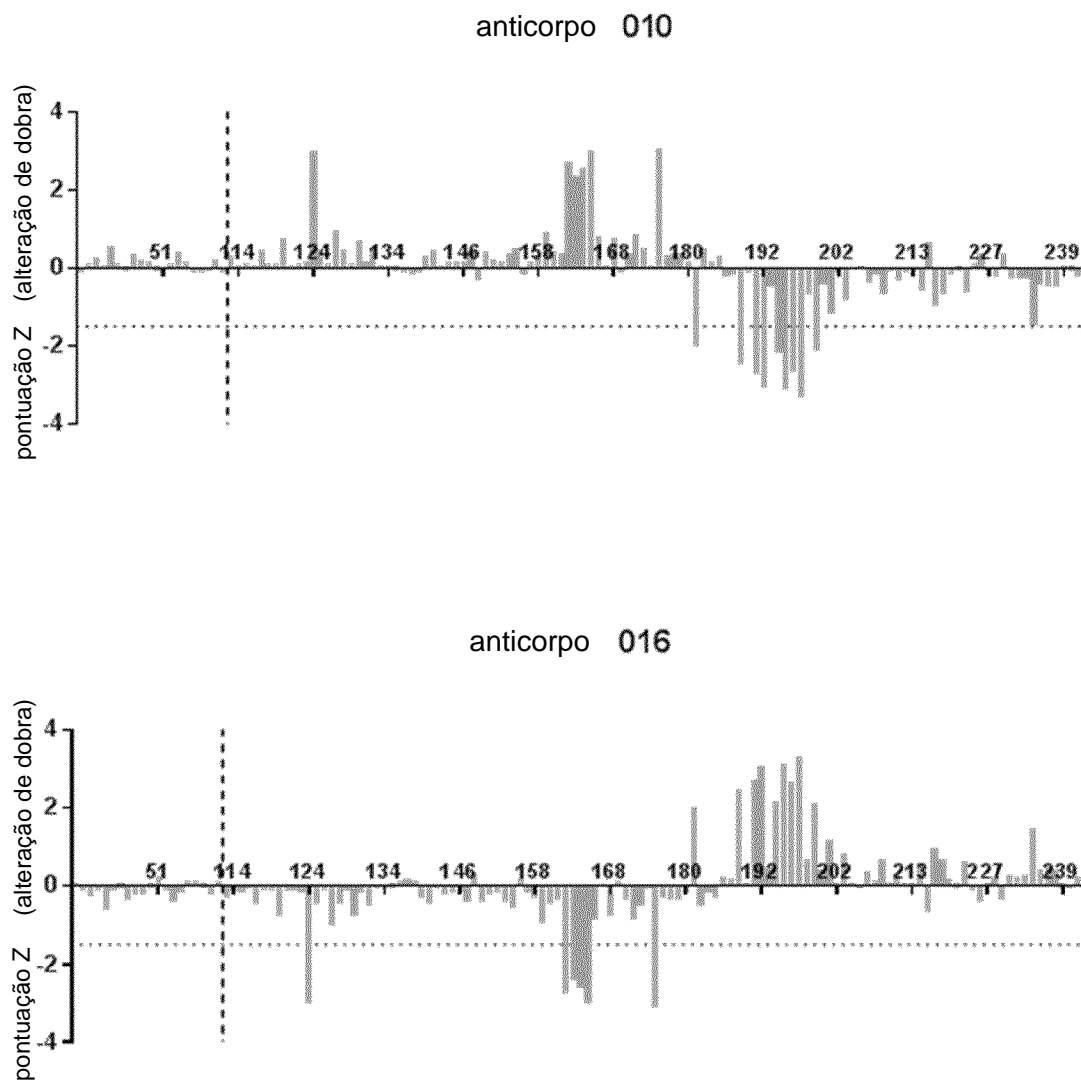
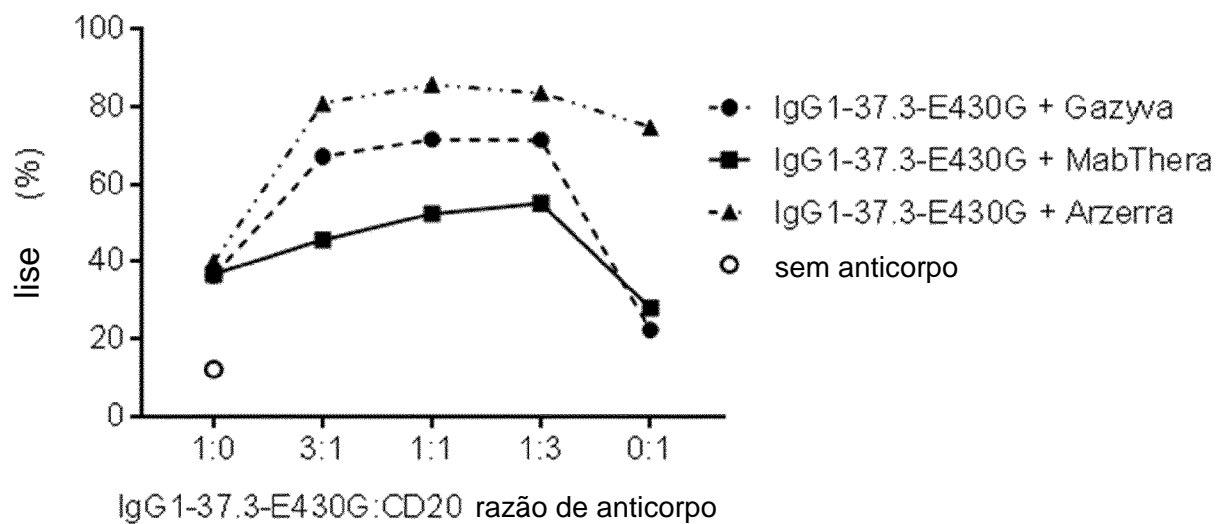
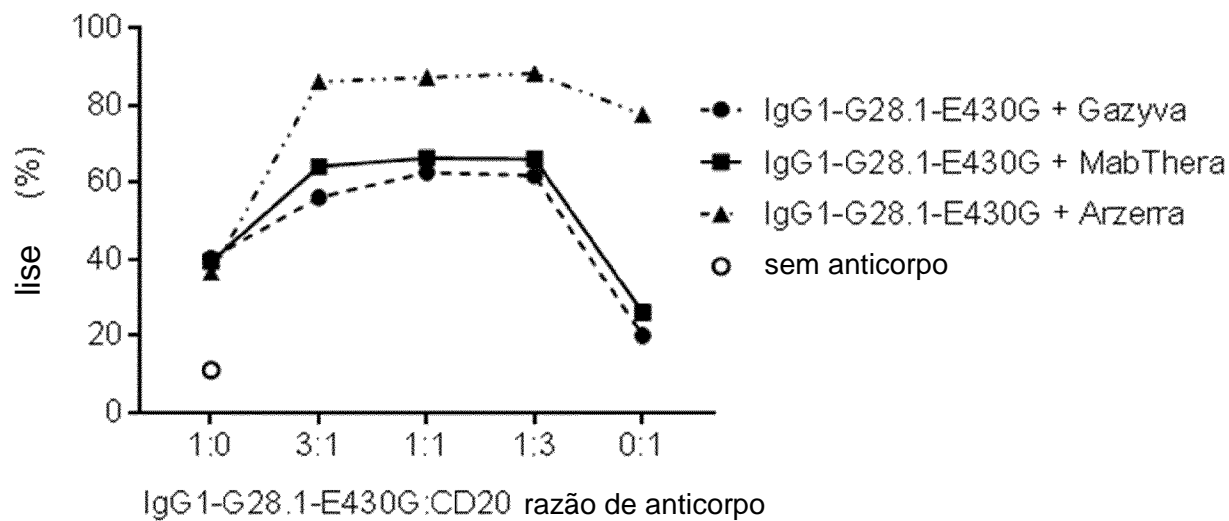


Figura 26

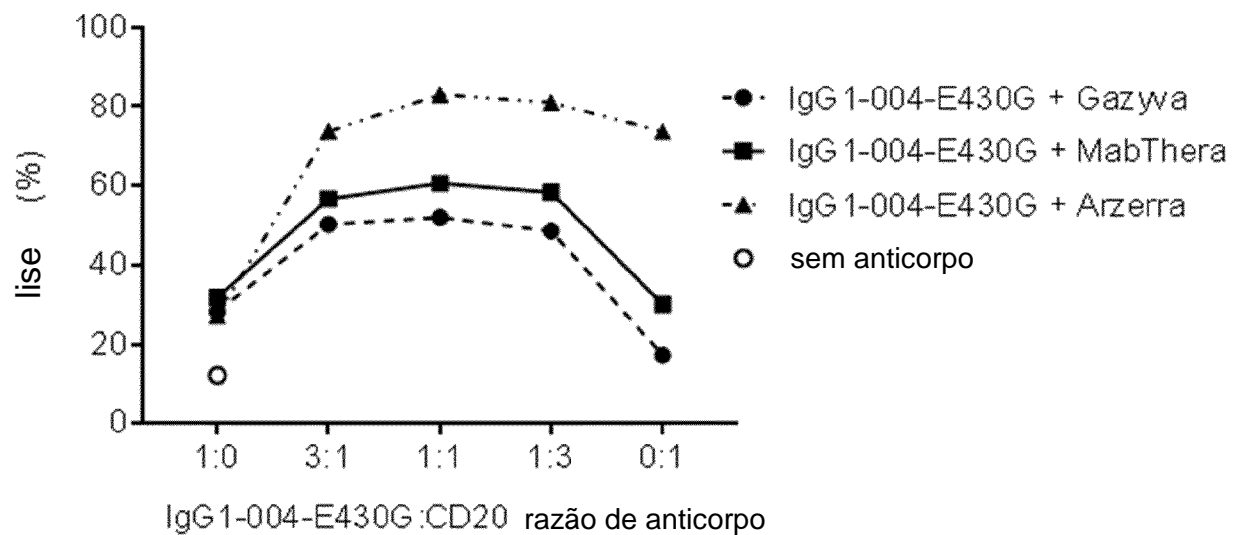
A



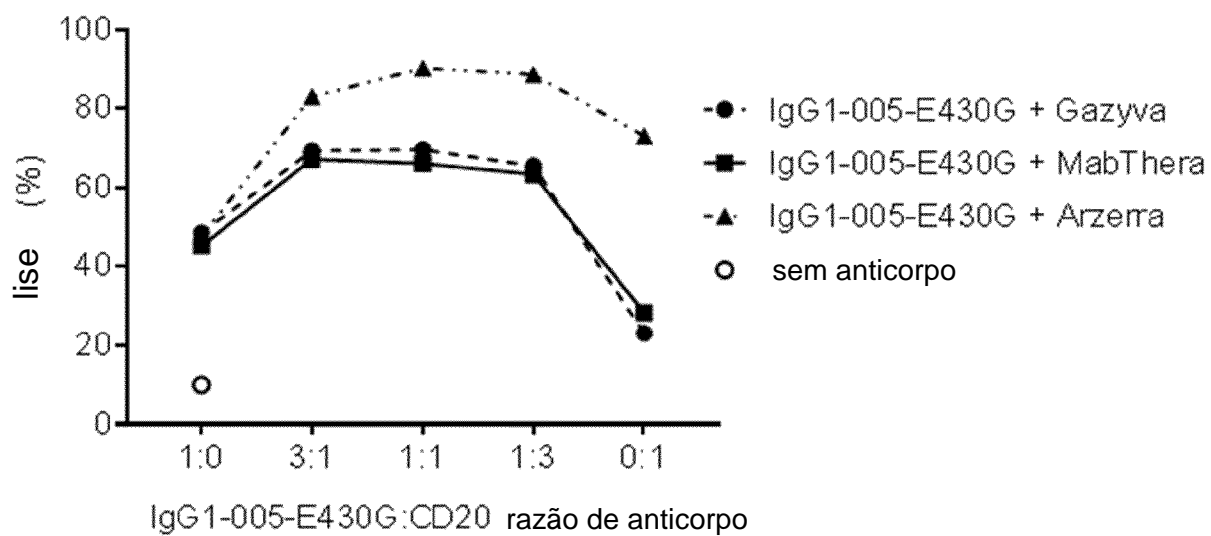
B



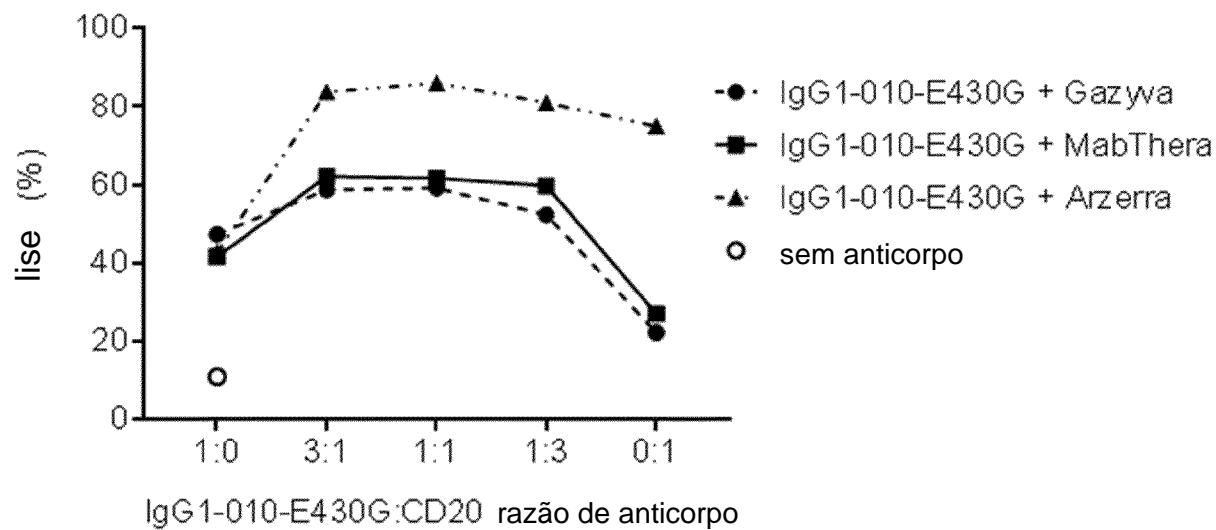
c



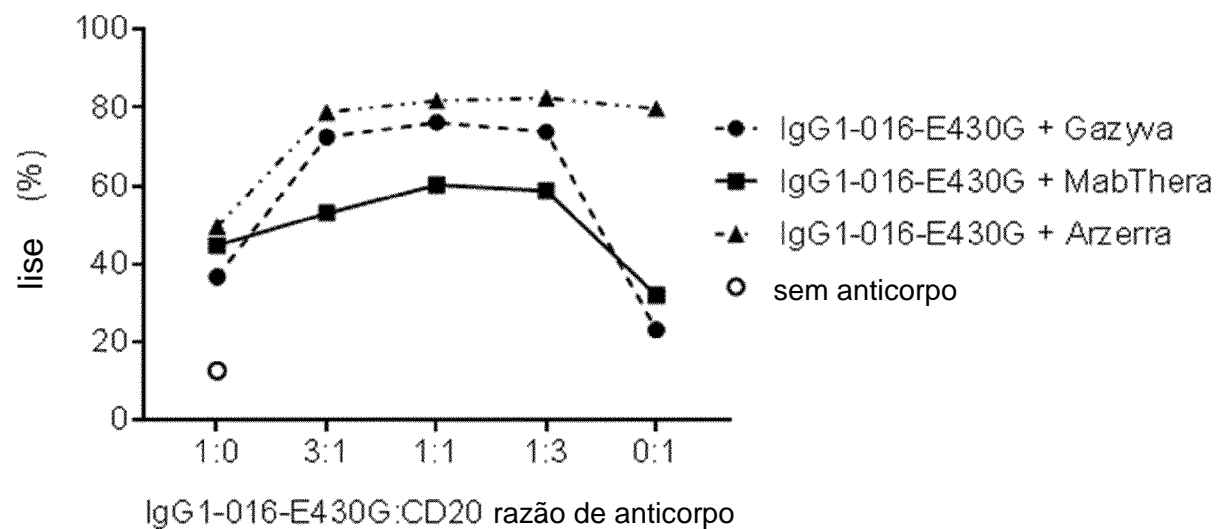
d



E



F



RESUMO

ANTICORPO BIESPECÍFICO, ANTICORPO ANTI-CD37, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO BIESPECÍFICO, DO ANTICORPO ANTI-CD37 OU DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA INDUZIR A MORTE CELULAR, OU INIBIR O CRESCIMENTO E/OU A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA TUMORAL QUE EXPRESSA CD37, MÉTODO DE TRATAMENTO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, ANTICORPO ANTI-IDIOTÍPICO, E, MÉTODO *IN VITRO* PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM ANTÍGENO CD37 HUMANO OU UMA CÉLULA QUE EXPRESSA CD37 HUMANO

Moléculas de anticorpo biespecífico específicas de CD37 que se ligam a diferentes epítomos do antígeno CD37 humano cujas moléculas de anticorpos biespecíficos melhoraram as interações Fc-Fc após a ligação a CD37 na superfície da célula. A invenção também se refere aos anticorpos parentais monoclonais dos quais é obtida a primeira ou a segunda região de ligação das moléculas de anticorpo biespecífico. A invenção também se refere a composições farmacêuticas contendo essas moléculas e ao tratamento de câncer e outras doenças utilizando essas composições.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: list seq.txt
- Data de Geração do Código: 26/09/2019
- Hora de Geração do Código: 18:17:27
- Código de Controle:
 - Campo 1: 69E70008F451FE91
 - Campo 2: 05B1A580E4E998E5