

ANTIANTICUERPOS GPRC5D, MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO BIESPECÍFICAS QUE SE UNEN A GPRC5D Y CD3, Y USOS DE ESTAS

Listado de secuencias

5 La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presenta electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia. Dicha copia ASCII, creada el 28 de junio de 2017, se denomina PRD3422USNP_SL.txt y su tamaño es de 57.673 bytes.

10 **Campo técnico**

 La invención proporcionada en la presente descripción se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor acoplado a la proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D), a anticuerpos multiespecíficos que se unen específicamente a GPRC5D y al determinante agregado 3 (CD3), y a métodos para
15 producir y usar los anticuerpos descritos.

Antecedentes

 El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia maligna hematológica más común y constituye el 2 % de todas las muertes por cáncer. El MM es una enfermedad
20 heterogénea y su causa es entre otras, principalmente por translocaciones cromosómicas t(11 ; 14),t(4; 14),t(8;14),del(13),del(17) (Drach et al., (1998) Blood 92(3):802-809; Sockolosky et al., (2005) 106:8, 2837-2840. Facon et al., (2001) Blood 97(6): 1566-1571). Los pacientes afectados con MM pueden experimentar una variedad

de síntomas relacionadas con la enfermedad causados por infiltración de la médula ósea, destrucción ósea, insuficiencia renal, inmunodeficiencia, y carga psicosocial de un diagnóstico de cáncer. Hasta el 2006, la tasa de supervivencia relativa de 5 años para la MM fue aproximadamente del 34 %, lo que destaca que la MM es una

5 enfermedad difícil de tratar, para la que en la actualidad no existen opciones curativas.

El receptor acoplado a la proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D) es un GPCR huérfano, atípico, de clase C, identificado por primera vez en 2001 (Bräuner-Osborne et al. *Biochim Biophys Acta*. 1518(3):237-248, 2001). El GPRC5D y otros GPCR del grupo 5 inusualmente tienen dominios aminotermiales cortos para
 10 los receptores de clase C y, por lo tanto, está previsto que tendrán configuraciones moleculares similares a los receptores de clase A. En este sentido, son únicos, con homología de secuencias respecto de los GPCR de clase C y una topología estructural prevista comparable a la de los receptores de clase A. La consecuencia funcional de la activación de GPRC5D no se ha descrito y el ligando aún se
 15 desconoce. El gen tiene tres exones y está ubicado en el cromosoma 12p13.3 en humanos. El receptor de GPRC5D está altamente conservado entre varias especies y comparte 92 % de identidad con el GPRC5D de *monodelphis domestica*.

El ARNm de GPRC5D se expresa mayormente en todas las células plasmáticas malignas de pacientes con MM (Atamaniuk JA et al. *Eur J Clin Invest* 42(9) 953-960; 2012; Frigyesi-blood and Cohen, et al. *Hematology* 18(6): 348-35; 2013). La expresión de GPRC5D es variable entre los pacientes y está bien correlacionada con la carga celular plasmática y aberraciones genéticas tal como la delección de Rb-1 (Atamaniuk JA et al. *Eur J Clin Invest* 42(9) 953-960; 2012).

Esta expresión exclusiva de GPRC5D en el linaje de células plasmáticas lo designa como un objetivo ideal para los anticuerpos antimieloma.

Sumario

5 En la presente descripción, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a GPRC5D y fragmentos de unión al antígeno de estos. Se describen, además, polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D proporcionados, células que expresan los anticuerpos proporcionados y los fragmentos de unión al
10 antígeno, así como también vectores asociados y anticuerpos marcados detectables y fragmentos de unión al antígeno. Adicionalmente, se describen métodos para usar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de GPRC5D y los fragmentos de unión de antígenos podrían usarse para diagnosticar o monitorear la progresión, la regresión o la estabilidad del
15 cáncer que expresa GPRC5D; para determinar si un paciente debe recibir o no tratamiento para cáncer; o para determinar si un sujeto sufre de un cáncer que expresa GPRC5D o no y, así, podría ser susceptible de tratamiento con un agente terapéutico anticáncer específico de GPRC5D, tal como los anticuerpos multiespecíficos contra GPRC5D y CD3 descritos en la presente descripción.

20 En la presente descripción se proporcionan, además, anticuerpos multiespecíficos que se unen inmuno específicamente a GPRC5D y CD3 y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos. Se describen, además, polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3, células que expresan los

anticuerpos proporcionados, así como también vectores asociados y anticuerpos multiespecíficos marcados detectables. Adicionalmente, se describen los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 podrían usarse para diagnosticar o monitorear la progresión, la regresión o la estabilidad del cáncer que expresa GPRC5D; para determinar si un paciente debe recibir o no tratamiento para cáncer; o para determinar si un sujeto sufre de un cáncer que expresa GPRC5D o no y, así, podría ser susceptible de tratamiento con un agente terapéutico anticáncer específico de GPRC5D, tal como los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D y CD3 descritos en la presente descripción.

Anticuerpos específicos para GPRC5D

En la presente descripción se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D aislados. En algunas modalidades, los fragmentos de unión al antígeno y los anticuerpos específicos para GPRC5D unen el GPRC5D humano. En algunas modalidades, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D unen GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus. En algunas modalidades, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D se unen a uno o más residuos de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident. 22. Este anticuerpo específico para GPRC5D o fragmento de unión a antígeno pueden inducir ADCC *in vitro* con una EC₅₀ de 28 nM o menor.

La Tabla 1 proporciona un resumen de los ejemplos de algunos anticuerpos específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción:

Tabla 1. Secuencias de CDR de los mAbs generados contra GPRC5D humano

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 1)	GIPIFGTAN YAQKFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 5)	ESRWRYGK LD (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 9)	RASQSISSY LN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 13)	AASSLQS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 16)	QQSYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 19)
5 GC5B465 GC5B597	NYWMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 2)	GISYSGGSK YYASSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 6)	AAFDGRR AVRLD (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 10)	RASQSISSY LN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 13)	AASSLQS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 16)	QQSYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 19)
GC5B483 GC5B599	SYFIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 3)	IIYPGKSDT RYSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 7)	VYSFGGRH KALFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 11)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
10 GC5B596	GYTMN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 4)	LINPYNSDT NYAQKLQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 8)	VALRVALDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 12)	KASQNVATH VG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 15)	SASYRYS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 18)	QQYNRYPY T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 21)
15 GC5B382	DYGMH (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 61)	AIKYSGGST YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 67)	RAESGPGL DY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 72)	KSSQSVLYS SNNKNYLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 98)	WASTRES (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 78)	QQYYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 80)
GC5B379	NYWMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 2)	GISYSGGSK YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 28)	AAWDFGRR AVRLDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 30)	RASQSISSY LN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 13)	AASSLQS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 16)	QQSYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 19)
GC5B373	SYWIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 27)	IIYPGDSDT RYSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 29)	IGFYGRSFR IFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 73)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
20 GC5B376	SYWIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 27)	IIYPGDSDT RYSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 29)	VYSFGGRH KALFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 11)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
GC5B385	GYAMS	AISGSGGST YYADSVKG	VDRSFGRS RYTLDY	RASQSVSS YLA	DASNRAT	QQRSNWPL T

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 62)	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 68)	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 74)	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	(SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
5 GC5B370 GC5B598	SYGIS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 63)	GIPIFGNIN YAQKFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 69)	VSRRFKRF AYYFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 75)	KSSQSVLYS SNNKNYLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 98)	WASTRES (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 78)	QQYYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 80)
GC5B602	GYSFTGYT MN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 64)	LINPYNGDT N (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 70)	VALRVALDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 12)	KASQNVAT HVG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 15)	SASYRYS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 18)	QQYNRYPY T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 21)
10 GC5B603	SYAMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 65)	AISGSGGST YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 68)	SNFLPVVFD Y (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 76)	RASQSVRK SLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 95)	TASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 79)	QQYFRAPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 81)
GC5B601	GFSLTSYNV H (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 66)	VIWAGGST NYNSALMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 71)	DGIRLRFAY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 77)	KASQNVAT HVG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 15)	SASYRYS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 18)	QQYNRYPY T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 21)

15

En algunas modalidades se presenta un anticuerpo específico para GPRC5D, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades se presenta un anticuerpo específico para GPRC5D, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una

20 cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo

específico para GPRC5D o fragmento de unión al antígeno de este compete por unirse a GPRC5D con un anticuerpo o antígeno de unión que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc, pero muestran grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores Fc (FcγR) en la superficie de las células inmunitarias efectoras, tales como células asesinas y macrófagos, lo que lleva a la fagocitosis o lisis de las células objetivo. En la CDC, los anticuerpos matan las células objetivo al disparar la cascada de complementos en la superficie de la célula. Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen los anticuerpos con las características descritas de los dominios variables en combinación con cualquiera de los isotipos IgG, que incluyen versiones modificadas en las que la secuencia Fc se ha modificado para lograr las funciones efectoras.

Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones de los efectores mediadas por Fc no son parte del mecanismo de acción. Estas funciones de efectores mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan un riesgo de seguridad al provocar toxicidad con el mecanismo desactivado. Modificar las

funciones de los efectores puede lograrse al hacer que las regiones Fc reduzcan su unión a las FcγR o a los factores de complemento. La unión de IgG a los FcγR activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 e IgG4 para reducir o silenciar las funcionalidades de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb y/o FcγRIIIa, (c) afinidad reducida a FcγRI (d) afinidad reducida a FcγRIIa (e) afinidad reducida a FcγRIIb, (f) afinidad reducida a FcγRIIIb o (g) afinidad reducida a FcγRIIIa.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo tiene un isotipo IgG1, el anticuerpo contiene sustituciones L234A, L235A y/o K409R en la región Fc. En algunas modalidades en donde el anticuerpo has un isotipo IgG4, el anticuerpo contiene sustituciones de S228P, L234A, y L235A en su región de Fc. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden incluir estas modificaciones.

Además de los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos, se proporcionan, además, secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno descritos. En la presente descripción, se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así

como las células que expresan los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D proporcionados en la presente descripción. Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de insecto (tales como Sf7), células de levadura, células de plantas o células bacterianas (tal como E. coli). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas.

Métodos para usar anticuerpos específicos para GPRC5D

Se describen, además, los métodos para usar los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D. Los anticuerpos particulares que pueden usarse en los métodos que se describen en esta sección incluyen aquellos que tienen el conjunto de CDR descrito para los anticuerpos en la Tabla 1. Por ejemplo, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser útiles para tratar el cáncer, al interferir con la interacción GPRC5D-receptor o en donde el anticuerpo se conjuga a una toxina, lo que dirige así la toxina al cáncer que expresa GPRC5D. Además, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno podrían ser útiles para detectar la presencia de GPRC5D en una muestra biológica, tal como sangre o suero; para cuantificar la cantidad de GPRC5D en una muestra biológica, tal como sangre o suero; para diagnosticar cáncer que expresa GPRC5D; determinar un método para tratar a un sujeto que sufre de cáncer; o monitorear la progresión de cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D puede ser un linfoma, tal como un mieloma múltiple (MM). Los métodos descritos pueden llevarse a cabo antes de que el sujeto reciba tratamiento para cáncer que expresa GPRC5D, tal

como el tratamiento con un anticuerpo multiespecífico contra GPRC5D y CD3. Además, los métodos descritos pueden llevarse a cabo después de que el sujeto recibe el tratamiento para cáncer que expresa GPRC5D, tal como el tratamiento con un anticuerpo multiespecífico contra GPRC5D y CD3 descrito en la presente descripción.

5 Los métodos descritos para detectar GPRC5D en una muestra biológica incluyen exponer la muestra biológica a uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción.

 Los métodos descritos para diagnosticar cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto incluyen, además, exponer la muestra biológica a uno o más de los anticuerpos
10 específicos de GPRC5D o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción; sin embargo, los métodos incluyen, además, cuantificar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra; comparar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra con una muestra conocida estándar o de referencia; y determinar si los niveles de GPRC5D del sujeto entra dentro de los niveles de GPRC5D asociados con el cáncer.

15 En la presente descripción se describen, además, métodos para monitorear un cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto. Los métodos descritos incluyen exponer la muestra biológica a uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción; cuantificar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra que está unida por el anticuerpo, o el fragmento de
20 unión al antígeno de este; comparar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra con una muestra conocida estándar o de referencia o la cantidad de GPRC5D en una muestra similar obtenida previamente del sujeto; y determinar si los niveles de

GPRC5D del sujeto indican progresión, regresión o estabilidad del cáncer sobre la base de la diferencia en la cantidad de GPRC5D en las muestras comparadas.

Las muestras obtenidas, o derivadas de los sujetos son muestras biológicas tales como orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células
5 tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, o preparaciones histológicas.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos pueden marcarse para el uso con los métodos descritos, u otros métodos
10 conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente descripción, o fragmentos de unión al antígeno de estos, pueden marcarse con un radiomarcador, un marcador fluorescente, una etiqueta de epítipo, biotina, un marcador cromóforo, un marcador ECL, una enzima, rutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -ácido dietilenetriaminapentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y
15 beta-galactosidasa, o polihistidina o tales marcadores similares conocidos en la técnica.

Estuches con anticuerpos específicos para GPRC5D

En la presente descripción se describen estuches que incluyen los anticuerpos específicos para GPRC5D o los fragmentos de unión al antígeno de estos. Los
20 estuches descritos pueden usarse, además, para llevar a cabo los métodos para usar los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D proporcionados en la presente descripción, u otros métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. En algunas modalidades los estuches descritos pueden

incluir los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción y los reactivos para el uso en la detección de la presencia de GPRC5D en una muestra biológica. En consecuencia, los kits descritos pueden incluir uno o más de los anticuerpos, o un(os) fragmento(s) de unión al antígeno de estos, descritos en la presente descripción y un recipiente para conservar el anticuerpo o fragmento mientras no se use, las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento fijado a un soporte sólido, y/o las formas marcadas detectables del anticuerpo o fragmento, como se describe en la presente descripción.

10 **Anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3**

La redirección de los linfocitos T a las células MM que expresan GPRC5D a través del complejo TCR/CD3 representa una alternativa atractiva del enfoque. El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en un heterodímero TCR alfa (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) que se coexpresa en la superficie celular con las subunidades invariantes del CD3 marcado gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), zeta (ζ), y eta (η). El CD3 ϵ humano se describe bajo el código Uniprot P07766 (CD3E_HUMAN). Un anticuerpo anti CD3 ϵ descrito en el estado de la técnica es SP34 (Yang, SJ, el Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 reacciona con el CD3 de primates y humanos. SP34 está disponible de Pharmingen. Otro anticuerpo anti CD3 descrito en el estado de la técnica es UCHT-1 (ver la patente núm. WO2000041474). Otro anticuerpo anti CD3 descrito en el estado del arte es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; que se usó en ensayos clínicos Fase I/II de la GvHD, Anasetti et al, Transplantation 54.: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1 y BC-3 en que SP-34 reconoce un epítipo presente en

únicamente la cadena ϵ de CD3 (ver Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítipo al que contribuyen tanto la cadena γ como la ϵ . La secuencia de un anticuerpo con la misma secuencia que la del anticuerpo SP34 se menciona en las patentes núm. WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 y WO2010037838. Una secuencia que es idéntica en un 96 % al VH del anticuerpo SP34 se menciona en la patente de los EE. UU. núm. 8236308 (patente núm. WO2007042261).

En la presente descripción se describen anticuerpos multiespecíficos aislados que se unen a GPRC5D y CD3 ("anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3") y los fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une de manera inmuno-específica a GPRC5D.

En algunas modalidades, el brazo específico para GPRC5D del anticuerpo multiespecífico se une a GPRC5D humano y a GPRC5D de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo específico para GPRC5D de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos GPRC5D x CD3 se unen al dominio extracelular del GPRC5D humano. En modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico GPRC5D x CD3 es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno biespecífico. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado biespecífico GPRC5D x CD3 que comprende: a) una primera cadena pesada (HC1); b) una segunda cadena pesada (HC2); c) una primera cadena ligera (LC1); y d) una segunda cadena ligera (LC2), en donde la HC1 y la LC1 se aparean para formar un primer sitio de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a GPRC5D, y la HC2 y la LC2

se aparean para formar un segundo sitio de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a CD3, o un fragmento de unión biespecífico GPRC5D x CD3 de este.

En otra modalidad, se proporciona una célula aislada que expresa el anticuerpo o el fragmento de unión biespecífico de este. En algunas modalidades, el brazo de unión a

5 GPRC5D (o “brazo específico para GPRC5D”) del anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 se deriva de un anticuerpo contra GPRC5D descrito en la presente descripción (por ejemplo, de un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR enumeradas en la Tabla 1).

En algunas modalidades, el brazo específico para GPRC5D de los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos GPRC5D x CD3 son IgG, o
10 derivados de estas. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 (o “brazo específico para CD3”) del anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 se deriva del anticuerpo monoclonal SP34 en ratón, un isotipo IgG3/lambda de ratón. (K.R. Abhinandan y A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839). En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 del anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3
15 comprende un dominio VH y un dominio VL seleccionado de la Tabla 2.

Tabla 2. Cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo y el fragmento de unión al antígeno específicos para CD3.

VH	VL
20 CD3B219 (sec. con núm. de ident.: 99): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY YAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTK VDKRVESKYGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF	CD3B219 (sec. con núm. de ident.: 100): QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCALW YSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK	
--	--

La clase IgG se divide en cuatro isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en los seres humanos. Comparten más de 95 % de homología en las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc, pero muestran grandes diferencias en la composición de aminoácidos y la estructura de la región bisagra. La región Fc media las funciones de los efectores, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores Fc (FcγR) en la superficie de las células inmunitarias efectoras, tales como células asesinas y macrófagos, lo que lleva a la fagocitosis o lisis de las células objetivo. En la CDC, los anticuerpos matan las células objetivo al disparar la cascada de complementos en la superficie de la célula.

Para muchas aplicaciones de anticuerpos terapéuticos, las funciones de los efectores mediadas por Fc no son parte del mecanismo de acción. Estas funciones de efectores mediadas por Fc pueden ser perjudiciales y representan un riesgo de seguridad al provocar toxicidad con el mecanismo desactivado. Modificar las funciones de los efectores puede lograrse al hacer que las regiones Fc reduzcan su unión a las FcγR o a los factores de complemento. La unión de IgG a los FcγR activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb) e inhibidores (FcγRIIb) o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Se han introducido mutaciones en IgG1, IgG2 e IgG4 para reducir o silenciar las funcionalidades de Fc.

En una modalidad, el anticuerpo comprende una región Fc con una o más de las siguientes propiedades: (a) función de efector reducida cuando se compara con Fc parental; (b) afinidad reducida a Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb y/o Fcγ RIIIa, (c) afinidad reducida a Fcγ RI (d) afinidad reducida a Fcγ RIIa (e) afinidad reducida a Fcγ RIIb, (f) afinidad reducida a Fcγ RIIIb o (g) afinidad reducida a Fcγ RIIIa.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico es IgG, o un derivado de esta. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico, es IgG1 o un derivado de este. En algunas modalidades, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo IgG1 específico para CD3 del que se deriva el brazo de unión al CD3 comprende las sustituciones L234A, L235A, y F405L en la región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico, es IgG4 o un derivado de este. En algunas modalidades, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo IgG4 específico para CD3 del que se deriva el brazo de unión a CD3 comprende las sustituciones S228P, L234A, L235A, F405L, y R409K en la región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico se une a CD3ε en células T humanas primarias y/o en células T de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD3 del

que se deriva el brazo específico para CD3 del anticuerpo multiespecífico activa las células T CD4+ humanas primarias y/o las células T CD4+ de cynomolgus primarias.

Además de los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos, además se presentan secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos

- 5 multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos. En algunas modalidades, se proporciona un polinucleótido sintético aislado que codifica la HC1, la HC2, la LC1 o la LC2 del fragmento de unión biespecífico o del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3. Además, en la presente descripción se presentan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así como células que expresan los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3. Además,
- 10 se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de insecto (tales como Sf7), células de levadura, células de plantas o células bacterianas (tal como E. coli). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas. En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para generar el fragmento de unión
- 15 biespecífico o el anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 mediante el cultivo de células.

En la presente descripción se proporcionan, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos GPRC5D x CD3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 **Métodos para usar anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3**

Se describen los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos y los fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 y fragmentos multiespecíficos

de unión al antígeno de estos pueden ser útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto que los necesite. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D es un linfoma, tal como el mieloma múltiple.

Los métodos descritos para tratar un cáncer que expresa GPRC5D en un
5 sujeto que lo necesita incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 descrito o fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este. En algunas modalidades, el paciente es un mamífero, preferentemente, un ser humano. En modalidades preferidas se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene cáncer al administrar una
10 cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o del fragmento de unión al antígeno biespecífico de este a un paciente que lo necesita por un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

En la presente descripción se proporcionan, además, los métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerígenas al administrar una cantidad
15 terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o del fragmento de unión biespecífico de este para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células cancerígenas.

En la presente descripción se proporcionan, además, los métodos para redirigir una célula T a una célula cancerígena que expresa GPRC5D al administrar una
20 cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o el fragmento de unión biespecífico para redirigir una célula T a un cáncer.

Estuches con anticuerpos específicos para GPRC5D x CD3

En la presente descripción se describen estuches que incluyen los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos. Los estuches descritos pueden usarse para llevar a cabo los métodos para usar los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 proporcionados en la presente descripción, u otros métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. En algunas modalidades los estuches descritos pueden incluir los anticuerpos descritos en la presente descripción y los reactivos para el uso en el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D. En consecuencia, los estuches descritos pueden incluir uno o más de los anticuerpos multiespecíficos, o un(os) fragmento(s) de unión al antígeno multiespecífico(s) de estos, descritos en la presente descripción y un recipiente para conservar el anticuerpo o fragmento mientras no esté en uso, y/o las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento, el anticuerpo o fragmento fijado a un soporte sólido y/o las formas marcadas detectables del anticuerpo, como se describe en la presente descripción.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Perfil de unión dependiente de la concentración de mAbs anti-GPRC5D seleccionado contra GPRC5D humano y células HEK 293 no transfectadas. También se observó que tres mAbs, GC5B36, GC5B168 y GC5B205 se unen a las células HEK293 (GPRC5D nulo) no transfectadas.

Figura 2. Unión dependiente de la dosis de anticuerpos biespecíficos anti-GPCR5D x CD3 a células GPRC5D HEK293F.

Figura 3. El perfil de unión de los anticuerpos biespecíficos en células MM1R y H929 se comparó con las células GPCR5D HEK293 humanas sobreexpresadas y células HEK293 no transfectadas mediante FACS.

- 5 **Figuras 4A y 4B.** Citotoxicidad mediada por células T y activación de células T de anticuerpos anti-GPCR5D x CD3 contra células que expresan GPCR5D humano.

Figuras 5A y 5B Citotoxicidad mediada por células T y activación de células T de anticuerpos anti-GPCR5D x CD3 contra células que expresan cyno GPCR5D.

10

Figuras 6A y 6B. Los Abs GPCR5DxCD3 matan eficientemente las células H929 en el modelo de ratón NSG profiláctico. GCDB32 (6A) y GCDB35 (6B) resultaron en la inhibición completa del crecimiento tumoral en las dosis de 10 ug, y GCDB32 también logró una inhibición del 100 % del crecimiento tumoral en la dosis de 1 ug.

15

Figuras 7A y 7B. Comparación de la potencia en la ausencia (7A) y en la presencia (7B) del bloque Fc.

Figura 8A-8D. Unión de GCDB32 GCDB35, GCDB40 y GCDB43 a receptores Fcγ.

20

Figuras 9A y 9B. Evaluación de unión mediante FACS de mAbs derivados de hibridomas.

Figuras 10A y 10B. Citotoxicidad mediada por células T de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 contra células H929.

Figuras 11A-11E. Anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 de unión a líneas
5 celulares GPRC5D positivo (H929, MM1R, LP1, OPM2) y negativo (NALM6).

Figuras 12A-12D. Los Abs biespecíficos GPRC5DxCD3 son inhibidores tumorales potentes in vivo. Todos los Abs biespecíficos GPRC5D x CD3 (GCDB32 mostrado en 12A, GCDB53 mostrado en 12B, GCDB61 mostrado en 12C, y GCDB72 mostrado en
10 12D) inhibieron completamente el crecimiento tumoral de la célula mieloma múltiple (H929) en las dosis de 10 ug y 1 ug. La diferenciación se observó en la dosis de 0,1 ug, con respecto a que GCDB72 generó una inhibición del crecimiento tumoral de 80 %

Figura 13: Las líneas celulares GPRC5D⁺ MM1.R se tiñeron durante 60 minutos con
15 diversas concentraciones de anticuerpos primarios para medir los perfiles de unión a superficie (n=3). Se usó IgG4Fc humana marcada con ficoeritrina como un anticuerpo secundario para capturar la señal (Southern Biotech, clon HP6025). La unión se expresa como intensidad de fluorescencia media geométrica normalizada según se determina mediante FACS. La representación gráfica y el ajuste de los datos se
20 realizaron en GraphPad Prism 6 que usa regresión no lineal con pendiente variable (cuatro parámetros) y el método de los mínimos cuadrados.

Figuras 14A y 14B. Las líneas celulares GPRC5D⁺ se tiñeron durante 60 minutos con diversas concentraciones de anticuerpos FAB6300 y GC5M481 para medir los perfiles de unión a superficie. Se usó IgG4Fc humana marcada con ficoeritrina como un anticuerpo secundario para capturar la señal (Southern Biotech, clon HP6025). La unión se expresa como histogramas (línea negra para el isotipo y la línea roja indica el anticuerpo específico para GPRC5D (Figura 14A). La Figura 14B muestra el patrón de unión de las moléculas primarias en líneas celulares de mieloma múltiples GPRC5D⁺. La línea de puntos sombreada indica el control del isotipo y la línea continua indica la unión a moléculas primarias.

Figuras 15A y 15B. Se usó células mononucleares derivadas de médula ósea congeladas de dos pacientes con MM diferentes para evaluar la unión a anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3, en comparación con el control del isotipo IgG4, la citotoxicidad de células plasmáticas y la activación de células T. Para el ensayo de citotoxicidad se añadieron exógenamente células T del donador saludable normal a muestras de BM MNC del paciente y se incubaron con cuatro moléculas primarias durante 48 horas. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 se une a las células plasmáticas de manera dependiente a la dosis en todas las muestras de los donadores, y se registraron en el eje y las intensidades media de fluorescencia. Nótese la pérdida de las células plasmáticas vivas (CD138⁺) y la sobreexpresión concomitante de CD25 en las células T en respuesta al tratamiento con anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3.

Figura 16. Se implantó subcutáneamente en ratones NSG células de mieloma múltiple humanas MM.1S en el Día 0. Las PBMC humanas se inocularon por vía intravenosa en el día 7 del estudio. Se dosificó por vía intravenosa anticuerpos PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg y 50 µg/animal (equivalentes a 0,005, 0,05, 0,5 y 2,5 mg/kg, respectivamente)) y de control nulo en los Días 15, 18, 22, 24, 29, 32 y 36. Los tumores subcutáneos se midieron dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen medio del tumor, expresado en mm³ ± SEM de cada grupo. El tratamiento con anticuerpos GCDB72, cuando se dosificó a 1 µg (0,05 mg/kg), inhibió significativamente el crecimiento tumoral sc en comparación con PBS (TGI=64 %, p≤0,0001). Las dosis de GCDB72 de 10 µg/animal (0,5 mg/kg) y 50 µg/animal (2,5 mg/kg) hicieron retroceder completamente el crecimiento tumoral (p≤0,0001). Los anticuerpos de control nulo tuvieron un efecto insignificante o ningún efecto. La significancia estadística se evaluó mediante ANOVA bidireccional con comparaciones múltiples mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el software Graph Pad Prism (versión 6). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad (p) fue ≤0,05.

Figura 17. Se implantó a NSG por vía subcutánea células de mieloma múltiples humanas MM.1S en el Día 0. Las PBMC humanas se inocularon por vía intravenosa en el día 7 del estudio. Se dosificó por vía intravenosa anticuerpos PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg y 50 µg/animal (equivalentes a 0,005, 0,05, 0,5 y 2,5 mg/kg, respectivamente)) y de control nulo en los Días 15, 18, 22, 24, 29, 32 y 36. El peso corporal se presenta como peso corporal absoluto desde el inicio del tratamiento hasta el final del estudio

Descripción detallada de las modalidades ilustrativas

Definiciones

Varios términos relacionados con aspectos de la descripción se usan en toda la descripción y las reivindicaciones. Se asignará a dichos términos su significado
5 común en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán en forma consistente con las definiciones proporcionadas en la presente descripción.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el
10 contexto determine claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células y lo similar.

El término “aproximadamente” como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y lo similar, se entiende que comprende las variaciones hasta $\pm 10\%$ del valor
15 especificado, debido a que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, y así sucesivamente usados en la descripción y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente.”
20 En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos se exponen en la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades deseada buscadas para obtenerlas por la presente invención. Al menos, y no como un intento

de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse en virtud del número de dígitos significativos reportados y al aplicar técnicas comunes de redondeo.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros establecidos para el amplio
5 alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos que se exponen en los ejemplos ilustrativos se reportan de la manera más precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

“Aislado” significa un componente biológico (tal como ácido nucleico, péptido o
10 proteína) que se ha separado sustancialmente, producido separado de, o purificado fuera de los componentes biológicos de los organismos en los que el componente es de origen natural, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, y proteínas. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se han “aislado” incluyen, por lo tanto, los ácidos nucleicos y las proteínas purificadas mediante los métodos de purificación
15 estándares. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas “aislados” pueden ser parte de una composición y aún pueden aislarse si tal composición no es parte del medio ambiente nativo del ácido nucleico, péptido, o proteína. El término comprende, además, los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como además los ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Un
20 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno “aislado”, como se usa en la presente descripción, se destina para referirse a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que

se une específicamente a GPRC5D es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a GPRC5D). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de GPRC5D puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como las especies homólogas de GPRC5D).

“Polinucleótido”, mencionado como sinónimo de “molécula de ácido nucleico,” “nucleótidos” o “ácidos nucleicos,” se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. “Polinucleótido” incluye, sin limitación, ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. En adición, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o ambos ARN y ADN. El término polinucleótidos incluye, además, los ADN o los ARN que contienen una o más bases modificadas y los ADN o los ARN con esqueletos modificados por la estabilidad o por otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritoladas y bases inusuales tal como la inosina. Podrían realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, “polinucleótido” comprende las formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como además las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células. “Polinucleótido” comprende, además, cadenas de ácidos nucleicos relativamente cortas, frecuentemente mencionadas como oligonucleótidos.

El significado de “sustancialmente lo mismo” puede diferir en dependencia del contexto en el que usa el término. Debido a la variación natural de la secuencia similar a la que existe entre las cadenas pesadas y ligeras y los genes que las codifican, debería esperarse encontrar algún nivel de variación dentro de las secuencias de aminoácidos o los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, con poco o sin impacto sobre sus propiedades de unión únicas (p. ej., especificidad y afinidad). Tal expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como además al éxito evolutivo de las variaciones de la secuencia de aminoácidos conservadora, lo que no altera de forma apreciable la naturaleza de la proteína codificada. En consecuencia, en el contexto de las secuencias de ácido nucleico, “sustancialmente lo mismo” significa al menos 65 % de identidad entre dos o más secuencias. Preferentemente, el término se refiere a al menos 70 % de identidad entre dos o más secuencias, con mayor preferencia, al menos 75 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 80 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 85 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 90 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 91 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 92 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 93 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 94 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 95 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 96 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 97 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 98 % de identidad, y con mayor preferencia, al menos 99 % o de mayor identidad. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología =

núm. de posiciones idénticas/núm. total de posiciones x 100), al tener en cuenta el número de interrupciones, y la longitud de cada interrupción, que se necesita para introducir la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse
 5 mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado en el software ALIGN (versión 2.0), que usa una tabla de peso PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4. Adicionalmente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Needleman y
 10 Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

El grado de variación que puede ocurrir dentro de la secuencia de aminoácido de una proteína sin tener un efecto sustancial sobre la función de la proteína es mucho más inferior que una secuencia de ácido nucleico, ya que los mismos principios de degeneración no aplican a las secuencias de aminoácidos. En consecuencia, en el
 15 contexto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, “sustancialmente lo mismo” significa anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Otras modalidades incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D, que tienen marco,
 20 supercóntigo, u otras regiones no vinculantes que no comparten identidad significativa con los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, pero no incorporan uno o más CDR u otras secuencias necesarias para conferir la unión que son 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a tales

secuencias descritas en la presente descripción. Un “vector” es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido, o virus en el que puede insertarse operativamente otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación o la expresión del segmento.

Un “clon” es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro
 5 común por mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable in vitro por muchas generaciones. En algunos ejemplos proporcionados en la presente descripción, las células se transforman al transfectar las células con ADN.

Los términos “expresar” y “producir” se usan en forma de sinónimo en la
 10 presente descripción, y se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos comprenden la transcripción de un gen en ARN. Estos términos comprenden, además, la traducción de ARN en uno o más polipéptidos, y comprenden, además, todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de origen natural. La expresión y producción de un anticuerpo o
 15 fragmento de unión al antígeno de este puede ser dentro del citoplasma de la célula, o en el medio extracelular tal como el medio de crecimiento de un cultivo celular.

Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a cualquier éxito o marcas distintivas de éxito en la atenuación o mejoramiento de una lesión, patología o afección, que incluyen cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como, abatimiento,
 20 remisión y disminución de los síntomas o hacer la afección más tolerable para el paciente, por medio de reducir el índice de degeneración o deterioro, hacer el punto final de la degeneración menos debilitante, mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto o prolongar la duración de la supervivencia. El tratamiento podría evaluarse

mediante parámetros objetivos o subjetivos; que incluyen los resultados de un examen físico, examen neurológico o evaluaciones psiquiátricas.

Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo GPRC5D x CD3 puede variar de acuerdo a factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el género, y el peso de los individuos, y la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es, además, una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente benéficos.

“Anticuerpo” se refiere a todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD, e IgY) que incluyen varias formas monoméricas, poliméricas y quiméricas a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales (mAbs), y los polipéptidos similares a anticuerpos, tales como los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados están comprendidos específicamente en el término “anticuerpo”.

Los “fragmentos de unión al antígeno” son cualquier estructura proteica que puede exhibir afinidad de unión por un antígeno particular. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen los proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tales como técnicas de clivaje, de síntesis de péptidos, y recombinantes. Algunos fragmentos de unión al antígeno se componen de porciones de anticuerpos intactos que retienen la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo parental. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender al menos una región variable (ya sea una región variable de

cadena pesada o cadena ligera) o una o más CDR de un anticuerpo conocido para unirse a un antígeno particular. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen, sin limitación, diacuerpos y moléculas de cadena única así como además moléculas Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc, y Fv, anticuerpos de cadena única (Sc), cadenas ligeras individuales de anticuerpos, cadenas pesadas individuales de anticuerpos, fusiones quiméricas entre cadenas o las CDR de anticuerpos y otras proteínas, supercóntigos de proteínas, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en la patente núm. WO2007059782, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, y un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V.sub.H y C.sub.H1; un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y se llama, además, anticuerpos de dominios (Holt et al.; Trends Biotechnol. noviembre de 2003; 21(11):484-90); camélido o nanocuerpos (Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. enero de 2005; 5(1):111-24); una región determinante complementaria aislada (CDR, por sus siglas en inglés), y lo similar. Todos los isotipos de los anticuerpos pueden usarse para producir fragmentos de unión al antígeno. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden incluir marcos proteicos que no son anticuerpos que pueden incorporar los segmentos de polipéptidos en una orientación que confiere afinidad por un antígeno dado de interés, tales como los andamios de proteínas. Los fragmentos de unión al antígeno pueden producirse de manera recombinante o producirse mediante clivaje enzimático o

químico de anticuerpos intactos. La frase “un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este” podría usarse para indicar que un fragmento de unión al antígeno dado incorpora uno o más segmentos de aminoácidos del anticuerpo al que se hace referencia en la frase.

El término “CDR” se refiere a una región determinante de complementariedad (CDR) de la cual tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden supercóntigos o regiones marco. Los límites y longitudes exactas que definen las CDR están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, puede hacerse referencia a las CDR según las definiciones de Kabat, Chothia, de contacto o cualquier otra definición de límite. A pesar de los diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de superposición en lo que constituye las denominadas “regiones hipervariables” dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferir en áreas de longitud y límite con respecto a la región marco adyacente. Ver, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Publicación del NIH núm. 91-3242 (1991); Chothia et al., “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,” *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); y MacCallum et al., “Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography,” *J. Mol. Biol.* 262:732 (1996)), cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Típicamente, las CDR forman una estructura de bucle que puede clasificarse como una estructura canónica. El término “estructura canónica” se refiere a la conformación de la cadena principal adoptada por los bucles de unión al antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha descubierto que cinco de los seis bucles de unión al antígeno solo tienen un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica puede caracterizarse por los ángulos de torsión de la cadena principal del polipéptido. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de secuencias de aminoácidos en la mayoría de las partes de los bucles (Chothia et al., “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); Chothia et al., “Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions,” *J. Mol. Biol.* 134:877 (1989); Martin y Thornton, “Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies,” *J. Mol. Biol.* 263:800 (1996), cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular se determina por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (es decir, fuera del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular puede realizarse en base a la presencia de estos residuos de aminoácidos claves.

El término “polipéptido” se usa indistintamente con el término “proteína” y en su sentido más amplio se refiere a un compuesto de dos o más aminoácidos

subunitarios, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra modalidad, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, p. ej., éster, éter, etc. Como se usa en la presente descripción, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o artificiales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina, comúnmente, un polipéptido o una proteína.

“Une específicamente específica” o “específicamente une” o derivados de esta, cuando se usa en el contexto de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, representa la unión a través de los dominios codificados por los genes de inmunoglobulinas o los genes de fragmentos de inmunoglobulinas a uno o más epítomos de una proteína de interés sin unirse, preferencialmente, a otras moléculas en una muestra que contiene una población de moléculas mezcladas. Típicamente, un anticuerpo se une a un antígeno afín con una K_d menor que aproximadamente 1×10^{-8} M, como se mide mediante una resonancia de plasmones superficiales o un ensayo de unión a células. Las frases tales como anticuerpo “específico a [antígeno]” (p. ej., anticuerpo específico para GPRC5D) quieren expresar que el anticuerpo enumerado se une específicamente al antígeno enumerado.

“Polinucleótido”, mencionado como sinónimo de “molécula de ácido nucleico”, “nucleótidos” o “ácidos nucleicos”, se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. “Polinucleótido” incluye, sin limitación, ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que

es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. En adición, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o ambos ARN y ADN. El término

5 polinucleótidos incluye, además, los ADN o los ARN que contienen una o más bases modificadas y los ADN o los ARN con esqueletos modificados por la estabilidad o por otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tal como la inosina. Podrían realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, “polinucleótido” comprende las formas de polinucleótidos

10 modificadas química, enzimática o metabólicamente como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como además las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células. “Polinucleótido” comprende, además, cadenas de ácidos nucleicos relativamente cortas, frecuentemente mencionadas como oligonucleótidos.

Un “vector” es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido, o virus en el que

15 puede insertarse operativamente otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación o la expresión del segmento.

Como se usa en la presente descripción, el término “célula huésped” puede ser cualquier tipo de célula, por ejemplo, una célula primaria, una célula en cultivo o una célula de una línea celular. En modalidades específicas, el término “célula huésped” se

20 refiere a una célula transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula madre transfectada con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en generaciones venideras o

integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped. Los términos “expresión” y “producción” se usan en forma de sinónimo en la presente descripción, y se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos comprenden la transcripción de un gen en ARN. Estos términos comprenden, además, la traducción de ARN en uno o más polipéptidos, y comprenden, además, todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de origen natural. La expresión y producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede ser dentro del citoplasma de la célula, o en el medio extracelular tal como el medio de crecimiento de un cultivo celular. El significado de “sustancialmente lo mismo” puede diferir en dependencia del contexto en el que usa el término. Debido a la variación natural de la secuencia similar a la que existe entre las cadenas pesadas y ligeras y los genes que las codifican, debería esperarse encontrar algún nivel de variación dentro de las secuencias de aminoácidos o los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, con poco o sin impacto sobre sus propiedades de unión únicas (p. ej., especificidad y afinidad). Tal expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como además al éxito evolutivo de las variaciones de la secuencia de aminoácidos conservadora, lo que no altera de forma apreciable la naturaleza de la proteína codificada. En consecuencia, en el contexto de las secuencias de ácido nucleico, “sustancialmente lo mismo” significa al menos 65 % de identidad entre dos o más secuencias. Preferentemente, el término se refiere a al menos 70 % de identidad entre dos o más secuencias, con mayor preferencia, al menos 75 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 80 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 85 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 90 % de identidad, con

mayor preferencia, al menos 91 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 92 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 93 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 94 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 95 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 96 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 97 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 98 % de identidad, y con mayor preferencia, al menos 99 % o de mayor identidad. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{núm. total de posiciones} \times 100$), al tener en cuenta el número de interrupciones, y la longitud de cada interrupción, que se necesita para introducir la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado en el software ALIGN (versión 2.0), que usa una tabla de peso PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4. Adicionalmente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

El grado de variación que puede ocurrir dentro de la secuencia de aminoácido de una proteína sin tener un efecto sustancial sobre la función de la proteína es mucho más inferior que una secuencia de ácido nucleico, ya que los mismos principios de degeneración no aplican a las secuencias de aminoácidos. En consecuencia, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, “sustancialmente lo mismo” significa anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Otras modalidades incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D, que tienen marco, supercóntigo, u otras regiones no vinculantes que no comparten identidad significativa
 5 con los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, pero no incorporan uno o más CDR u otras secuencias necesarias para conferir la unión que son 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a tales secuencias descritas en la presente descripción.

El término “sujeto” se refiere a animales humanos y no humanos, que incluyen
 10 todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como los primates no humanos, ratones, conejos, carnero, perros, gatos, caballos, vacas, gallinas, anfibios, y reptiles. En muchas modalidades de los métodos descritos, el sujeto es un ser humano.

El término “redirigir” o “redireccionar” como se usa en la presente descripción, se refiere a la capacidad del anticuerpo GPRC5D x CD3 de dirigir eficazmente la
 15 actividad de las células T, de su especificidad cognado inherente hacia la reactividad frente a células que expresan GPRC5D.

El término “muestra”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos similares (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluye aspiración con aguja fina), aislado de un sujeto,
 20 así como además fluidos, células, o tejidos presentes dentro de un sujeto. En algunas modalidades la muestra es un fluido biológico. Los fluidos biológicos son, típicamente, líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos de origen natural presentes en, retirados de, expresados o extraídos de cualquier otra manera de un sujeto o fuente

biológica. Ciertos fluidos biológicos derivados de tejidos, órganos o regiones localizadas particulares y otros fluidos biológicos pueden situarse de forma global o sistémica en un sujeto o fuente biológica. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, saliva, fluido cístico, gotas de

5 lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosales de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, fluidos de ascitis tales como los asociados con tumores no sólidos, fluidos de la pleura, cavidad pericardial, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, fluidos recolectados mediante lavado bronquial, y lo similar. Los fluidos biológicos pueden incluir, además, soluciones líquidas puestas en contacto con

10 un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo celular y de órganos que incluyen medio celular condicionado y de órganos, fluidos lavados, y lo similar. El término “muestra,” como se usa en la presente descripción, comprende los materiales retirados de un sujeto o materiales presentes en un sujeto.

Un “estándar conocido” puede ser una solución que tiene una cantidad o

15 concentración conocida de GPRC5D, en donde la solución puede ser una solución de origen natural, tal como una muestra de un paciente que se conoce que tiene cáncer temprano, moderado, terminal, progresivo, o estático, o la solución puede ser una solución sintética tal como agua regulada que tiene una cantidad conocida de GPRC5D diluido. Los estándares conocidos, descritos en la presente descripción, pueden incluir

20 GPRC5D aislado de un sujeto, proteína GPRC5D recombinante o purificada o un valor de concentración de GPRC5D asociado con una condición de la enfermedad.

Como se usa en la presente descripción, los términos “receptor acoplado a la proteína G, familia C, grupo 5, miembro D” y “GPRC5D” incluyen, específicamente, a la

proteína GPRC5D humano, por ejemplo, como se describe en el núm. de acceso al GenBank BC069341, secuencia de referencia de NCBI: NP_061124.1 y núm. de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZD1 (ver, además, Brauner-Osborne, H. et al. 2001, Biochim. Biophys. Acta 1518, 237-248).

5 El término “CD3” se refiere al complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 humana. El complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 se compone de 6 cadenas polipeptídicas distintivas. Estas incluyen una cadena CD3 γ (SwissProt P09693), una cadena CD3 δ (SwissProt P04234), dos cadenas CD3 ϵ (SwissProt P07766), y un homodímero de la cadena de CD3 ζ (SwissProt 20963), y que se asocia
10 con la cadena α y β del receptor de células T. El término “CD3” incluye cualquier variante, isoforma y especie homóloga de CD3 que se expresa de forma natural por las células (que incluyen las células T) o puede expresarse en células transfectadas con los genes o ADNc que codifican los polipéptidos, a menos que se indique.

Un “anticuerpo GPRC5D x CD3” es un anticuerpo multiespecífico, opcionalmente
15 un anticuerpo biespecífico, que comprende dos regiones diferentes de unión al antígeno, una de las que se une específicamente al antígeno GPRC5D y una de las que se une específicamente a CD3. Un anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo, o molécula similar (ver, por ejemplo, *PNAS USA* 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). Los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos,
20 y lo similar, proporcionados en la presente descripción pueden unirse a cualquier objetivo adecuado en adición a una porción de GPRC5D. El término “anticuerpo biespecífico” debe entenderse como un anticuerpo que tiene dos regiones diferentes de unión al antígeno

definidas por secuencias diferentes del anticuerpo. Esto debe entenderse como unión a objetivo diferente, pero incluye, además, la unión a epítomos diferentes en un objetivo.

Una “muestra de referencia” es una muestra que puede compararse contra otra muestra, tal como una muestra de prueba, para permitir la caracterización de la muestra comparada. La muestra de referencia tendrá alguna propiedad caracterizada que sirve como la base para la comparación con la muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de referencia puede usarse como un punto de referencia para los niveles de GPRC5D de un sujeto que tiene cáncer. La muestra de referencia no tiene que analizarse en paralelo con la muestra de prueba, por lo tanto, en algunos ejemplos la muestra de referencia puede ser un valor o intervalo numérico determinado previamente para caracterizar una condición dada, tal como los niveles de GPRC5D que son indicativos de cáncer en un sujeto. El término incluye, además, muestras usadas para propósitos comparativos que se conoce se asocian con un estado o enfermedad o afección fisiológica, tal como el cáncer que expresa GPRC5D, pero que tiene una cantidad desconocida de GPRC5D.

El término “progresión,” como se usa en el contexto de la progresión del cáncer que expresa GPRC5D, incluye la variación de un cáncer desde un estado menos severo hasta uno más severo. Este puede incluir un aumento en el número o severidad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que crece o se expande el cáncer, y lo similar. Por ejemplo, “la progresión del cáncer de colon” incluye la progresión del cáncer desde un estado menos severo hasta uno más severo, tal como la progresión desde la etapa I hasta la etapa II, desde la etapa II hasta la etapa III, etc.

El término “retroceso,” como se usa en el contexto del retroceso del cáncer que expresa GPRC5D, incluye la variación de un cáncer desde un estado más severo hasta

uno menos severo. Esto podría incluir una disminución en el número o severidad de los tumores, el grado de metástasis, la velocidad con la que el cáncer crece o se expande, y lo similar. Por ejemplo, “el retroceso del cáncer de colon” incluye el retroceso de un cáncer desde un estado más severo hasta uno menos severo, tal como la progresión desde la etapa III hasta la etapa II, desde la etapa II hasta la etapa I, etc.

El término “estable”, como se usa en el contexto de cáncer estable que expresa GPRC5D, se destina a describir una condición de la enfermedad que varía, o no, significativamente suficiente durante un período de tiempo relevante para considerarse un cáncer progresivo o un cáncer en retroceso.

Las modalidades descritas en la presente descripción no son limitantes para métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares que pueden, por supuesto, variar.

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D

En la presente descripción se describen anticuerpos monoclonales aislados o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a GPRC5D. La estructura general de una molécula de anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno, que incluye las cadenas pesadas y ligeras, y el dominio Fc, que sirve para una variedad de funciones, que incluyen la fijación al complemento y la unión a los receptores del anticuerpo.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos incluyen todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y los multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Los anticuerpos o fragmentos de

unión al antígeno descritos incluyen, además, el isotipo IgY que se encuentra, generalmente, en suero de gallina o pavo y en yema de huevo de gallina y pavo.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D pueden derivarse de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser versiones quiméricas de estos en ratón, rata, carnero, caballo, cerdo, bovino, gallina, conejo, camélido, asno, o humano. Para el uso en la administración a humanos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos tras la administración a un paciente humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son quiméricos. Como se usa en la presente descripción, el término “quimérico” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que tiene al menos alguna porción de al menos un dominio variable derivado de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero que no es humano, un roedor, o un reptil, mientras las porciones del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno de este, se derivan de un humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina que no es humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de un CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como

ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas.

Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente, dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana, y sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden existir en una variedad de formas, pero incluirán una o más CDR de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1.

En la presente descripción se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno aislados que se unen inmuno específicamente a GPRC5D. En algunas modalidades, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D son IgG humana, o derivados de estas. Cuando los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D ejemplificados en la presente descripción son humanos, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno ejemplificados pueden quimerizarse.

En algunas modalidades se presenta un anticuerpo específico para GPRC5D, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. En algunas modalidades se presenta un anticuerpo específico para GPRC5D, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cualquiera de

los anticuerpos descritos en la Tabla 1 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 9. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 16 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 19. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 52. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 52 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 56. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena

ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 6 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 6, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 10, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 16 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 19. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 53. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 53 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 56. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena

ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 7 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 11. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 7, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 11, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 20. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 54. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 54 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 57. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena

ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 8 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 8, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 15, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 21. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 55. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 55 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 58. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena

ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 67 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 72. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 67, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 72, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 78 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 80. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 82. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 82 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 92. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 28 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 30. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 28, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 30, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 16 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 19. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 83. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 83 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 56. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena

ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 29 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 73. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 29, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 73, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 20. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 84. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 84 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 57. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 29 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 11. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 19, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 11, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 20. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 85. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 85 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 57. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 68 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 74. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 68, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 74, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 20. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 86. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 86 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 57. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 69 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 75. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 69, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 75, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 78 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 80. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 87. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 87 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 92. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 64, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 70 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 64, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 70, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 12, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 15, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 21. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 88. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 88 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 58. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 68 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 76. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 65, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 68, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 76, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 95, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 79 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 81. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 89. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 89 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 93. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 66, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 77. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden una CDR1 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 66, una CDR2 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 71, una CDR3 de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 77, una CDR1 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 15, una CDR2 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 21. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos para GPRC5D y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntico a, la sec. con núm. de ident.: 91. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 91 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 94. El dominio variable de cadena pesada y dominio variable

de cadena ligera de los anticuerpos tratados en este párrafo son adecuados para incluir en constructos biespecíficos en los que un brazo es un brazo anti-GPRC5D.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En algunas modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG1, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 (sec. con núm. de ident. 60).

SEC. CON NÚM. DE IDENT. 60

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

En algunas modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG4, el anticuerpo contiene las sustituciones S228P, L234A, y L235A en su región Fc (sec. con núm. de ident. 59).

SEC. CON NÚM. DE IDENT. 59

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Los anticuerpos específicos definidos por la secuencia de CDR y/o de dominio variable descrita en los párrafos anteriores pueden incluir estas modificaciones.

En la presente descripción se describen polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen de manera

- 5 inmunoespecífica a GPRC5D. Los polinucleótidos aislados capaces de codificar los segmentos de dominio variable proporcionados en la presente descripción pueden incluir los mismos, o diferentes, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno. Un ejemplo de una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo de GPRC5D se muestra a continuación:

10

secuencia de cadena pesada (sec. con núm. de ident.: 96).

atggcctgggtctggaccctgctgttctgatggccgctgccagagcatccaggcccagggtgcagctggtgca
gagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtagctgcaaggccagcggctacagcttcaccgg
ctacacatgaactgggtgcggcaggccccggccaggcctggagtggatgggcctgatcaaccctacaacagcg
15 acaccaactacgcccagaagctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccagcaccagcaccgcctacatgga
gctgcggagcctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgcgcccgggtggccctgcgggtggccctggactactg
gggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgccctccaccaagggccatccgtcttccccctggcgccctgctccagg
agcacctccgagagcacagccgccctgggtgcctgggtcaaggactactccccgaaccggtagcgggtgctgtggaact
caggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtg
20 accgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtgga
caagagagttgagtccaaatatggtcccccattgccaccatgccagcacctgaggccgcccgggggaccatcagttctc
ctgttccccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctgtggtggacgtgagcca
ggaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccggagg

agcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaacggcaaggagtacaa
 gtgcaaggttccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaacatctccaaagccaaagggcagccccgagagc
 cacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggct
 tctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
 5 ctggactccgacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctc
 atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaata

Secuencias de cadena ligera (sec. con núm. de ident.:90):

Atgcgggtgctggcccagctgctgggactgctgctgctgtgcttccctggcgccagatgcgacatccagatgacctagag
 10 cccagcagcctgagcgccagcgtgggcgaccgggtgacctcacctgcaaggccagccagaacgtggccaccac
 gtgggctggtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcgccagctaccggtacagcggcgt
 gccagccggttcagcggcagcggcagcggcaccgagttcacctgacctcagcaacctgcagcccaggacttcg
 ccacctactactgccagcagtacaaccggtacccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaagcgtacgg
 ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataact
 15 tctatcccagagaggccaaagtacagtgaagggtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacag
 agcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacaca
 aagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctcacaagagcttaacaggggagagtgttga

Los polinucleótidos que codifican proteínas recombinantes de unión al antígeno
 20 están, además, dentro del alcance de la descripción. En algunas modalidades, los
 polinucleótidos descritos (y los polipéptidos que ellos codifican) incluyen una secuencia
 líder. Puede usarse cualquier secuencia líder conocida en la técnica. La secuencia líder
 puede incluir, pero no se limita a, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción incluyen variantes que tienen sustituciones, deleciones, o adiciones de aminoácidos únicas o múltiples que retengan las propiedades biológicas (p. ej., la afinidad de unión o la actividad efectora inmunitaria) de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D. En el contexto de la presente invención, las siguientes notaciones se usan, a menos que se indique de cualquier otra forma, para describir una mutación; i) la sustitución de un aminoácido en una posición dada se escribe como, por ejemplo, S228P, lo que significa una sustitución de una serina en la posición 228 con una prolina; y ii) para variantes específicas los códigos específicos de una o tres letras, que incluyen los códigos Xaa y X, se usan para indicar cualquier residuo de aminoácidos. Por lo tanto, la sustitución de serina por arginina en la posición 228 se designa como: S228P, o la sustitución de cualquier residuo de aminoácido por serina en la posición 228 se designa como S228P. En el caso de deleción de serina en la posición 228 esta se indica por S228*. La persona con experiencia puede producir variantes que tienen sustituciones, deleciones, o adiciones únicas o múltiples de aminoácidos.

Estas variantes pueden incluir: (a) variantes en las que se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden o se delecionan uno o más aminoácidos del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que se fusiona el polipéptido con otro péptido o polipéptido tales como una pareja de fusión, una etiqueta de proteína u otra porción química, que pueden conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una

secuencia de polihistidina, una porción de biotina y lo similar. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden incluir variantes en las que se sustituyen los residuos de aminoácidos de una especie por el residuo correspondiente en otras especies, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En otras modalidades, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas se sustituyen con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas para obtener estas variantes, que incluyen técnicas genéticas (deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, se conocen bien por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción pueden incorporar varios isotipos de anticuerpos, tales como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En algunas modalidades el isotipo de anticuerpos es isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, preferentemente, isotipo IgG1 o IgG4. La especificidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se determina en buena parte por la secuencia de aminoácido, por la disposición, o las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo pueden transferirse a otro isotipo sin alterar la especificidad por el antígeno. Alternativamente, las técnicas se han establecido para producir hibridomas que cambien la producción de un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad por el antígeno. En consecuencia, tales isotipos de anticuerpo están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos.

Además, se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en la presente descripción. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés se consideran dentro del alcance de esta descripción. El

vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero no se limitan a, las secuencias reguladoras (p. ej., promotor, potenciador), un marcador de selección, y una señal de poliadenilación. Los vectores para transformar una amplia variedad de células huésped se conocen bien e incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como además otros vectores bacterianos, de levaduras y virales.

Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos, o derivados de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados. Tales elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos, puede incluir, además, uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado unido al gen a expresar, otras secuencias flanqueantes 5' o 3' sin transcribir, secuencias 5' o 3' sin transcribir (tales como los sitios necesarios de unión a ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios de corte donantes y aceptores, o secuencias de terminación transcripcional. Puede incorporarse, además, un origen de replicación que confiere la capacidad de replicarse en un huésped.

Las secuencias control transcripcionales y traduccionales en los vectores de expresión para usarlas en las células de vertebrados transformantes pueden

proporcionarse por fuentes virales. Los ejemplos ilustrativos pueden construirse como se describe en Okayama y Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

En algunas modalidades, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo poderoso, tales como los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina deaminasa, piruvato cinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana, et al. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. Tales promotores virales incluyen sin limitación, citomegalovirus (CMV) promotor temprano inmediato, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Maloney, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), et al. retrovirus, y el promotor cinasa de timidina del virus del herpes simple. En una modalidad, la secuencia que codifica el anticuerpo específico para GPRC5D o el fragmento de unión al antígeno de este se coloca bajo el control de un promotor inducible tal como el promotor de metalotioneina, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por doxíciclina, promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) tales las sintetasas de proteína cinasa R 2',5'-oligoadeniladas, genes Mx, ADAR1, y lo similar.

Los vectores descritos en la presente descripción pueden contener uno o más sitios de entrada al ribosoma internos (IRES). La inclusión de una secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para potenciar la expresión de algunas

proteínas. En algunas modalidades, el sistema de vectores incluirá uno o más sitios de poliadenilación (p. ej., SV40), que puede estar corriente arriba o corriente abajo de cualquier secuencia de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente. Los componentes del vector pueden unirse de forma contigua, o disponerse de una forma que

5 proporcione espacio óptimo para la expresión de los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos “espaciadores” entre los ORF), o posicionarse de otra manera. Los elementos regulatorios, tales como los motivos IRES, pueden disponerse, además, para proporcionar espacio óptimo para la expresión.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección, que se conocen bien

10 en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a penicilina, un gen de resistencia a la puromicina, un gen de resistencia a la blasticidina), genes de la glutamato sintasa,

15 derivados de HSV-TK, HSV-TK para la selección con ganciclovir, o gen de la purina nucleósido fosforilasa bacteriana para la selección con 6-metilpurina (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

20 Los vectores descritos en la presente descripción pueden usarse para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, pueden usarse los vectores para generar anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D. Por lo tanto, otro aspecto

caracteriza a las células huésped transformadas con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a GPRC5D, tales como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos y ejemplificados en la presente descripción.

5 Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células y pueden usarse para construir las células recombinantes para propósitos de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las varias modalidades descritas y ejemplificadas en la presente descripción. La técnica usada proporcionaría la transferencia estable de la secuencia de genes heterólogos a la
10 célula huésped, tal que la secuencia de genes heterólogos sea heredable y expresable por la progenie celular, y de manera que no se afecten las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, transferencia de cromosomas (p. ej., fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica
15 mediada por micro células), métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, portador de liposomas), transferencia de vectores virales (p. ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y lo similar (descritas en Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)). La precipitación con fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos
20 bacterianos con células de mamíferos pueden usarse para transformar células.

Las células adecuadas para el uso en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción son, preferentemente, células eucarióticas, más preferentemente, células

de plantas, roedores, o de origen humano, por ejemplo, pero sin limitarse a NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, células HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0, y líneas celulares BHK, entre otras.

En adición, la expresión de anticuerpos puede lograrse mediante el uso de células de
5 hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

Las células transformadas con vectores de expresión descritos en la presente descripción pueden seleccionarse o analizarse para expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción.

Las células positivas recombinantes se expanden y se analizan con respecto a

10 subclones que exhiben un fenotipo deseado, tal como nivel de expresión alto, propiedades de crecimiento potenciadas, o la capacidad para rendir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de las proteínas o a las modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a las propiedades inherentes de un subclón dado o la mutación. Las
15 mutaciones pueden efectuarse a través del uso de productos químicos, luz UV de longitud de onda, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación ADN no coincidente, o una combinación de tales métodos.

Métodos para usar anticuerpos específicos para GPRC5D para tratamiento

20 En la presente descripción se proporcionan anticuerpos específicos para GPRC5D o fragmentos de unión al antígeno de estos para el uso en la terapia.

Particularmente, estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer que expresa GPRC5D. En

consecuencia, la invención proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar un anticuerpo como se describe en la presente descripción, tal como los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D. Por ejemplo, el uso puede ser al interferir con las interacciones receptor-GPRC5D o donde el

5 anticuerpo está conjugado con una toxina, para direccionar la toxina al cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye linfoma, tal como el mieloma múltiple (MM). Los anticuerpos que pueden usarse en estos métodos incluyen aquellos descritos anteriormente en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para GPRC5D

10 con las características que se presentan en la Tabla 1, por ejemplo, las CDR o secuencias de dominio variable, y en la descripción adicional de estos anticuerpos.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, las propiedades efectoras inmunitarias de los anticuerpos específicos para GPRC5D pueden potenciarse o silenciarse a través de las modificaciones de Fc mediante técnicas conocidas por aquellos

15 con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las funciones efectoras del Fc tales como unión a Clq, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), regulación negativa de los receptores de superficie celular (p. ej., el receptor de las células B; BCR), etc. pueden proporcionarse y/o controlarse por la

20 modificación de residuos en el Fc responsable de estas actividades.

“Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos” o “ADCC” se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (p. ej., células Natural Killer (NK),

neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula objetivo y causan subsecuentemente lisis de la célula objetivo.

La habilidad de los anticuerpos monoclonales para inducir ADCC puede mejorarse por la modificación de sus componentes oligosacáridos. La IgG1 o IgG3 humanas están N-glicosiladas en la Asn297 con la mayoría de los glicanos en las formas biantenarias bien conocidas G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. Los anticuerpos producidos por células CHO no manipuladas genéticamente tienen, típicamente, un contenido del glicano fucosa de aproximadamente al menos 85 %. La eliminación del núcleo de fucosa del oligosacárido tipo complejo biantenario unido a la región Fc aumenta la ADCC de los anticuerpos a través de la unión mejorada a Fc.gamma.RIIIa sin alterar la unión del antígeno o la actividad CDC. Tales mAbs pueden lograrse por medio del uso de diferentes métodos que se informó llevan a la expresión exitosa de anticuerpos con relativamente alta defucosilados que portan oligosacárido del Fc tipo complejo biantenario tales como el control de la osmolalidad del cultivo (Konno et al., Cytotechnology 64:249-65, 2012), la aplicación de una variante de la línea CHO Lec13 como la línea celular huésped (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-26740, 2002), la aplicación de una variante de la línea CHO EB66 como la línea celular huésped (Olivier et al., MAbs; 2(4), 2010. Publicación electrónica antes de la impresión; PMID:20562582), aplicación de una línea celular YB2/0 de hibridoma como la línea celular huésped (Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), introducción de ARN de interferencia pequeño específicamente contra la.alfa. El gen de la 1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004), o la coexpresión de la β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y de la α -manosidasa II

de Golgi o de un inhibidor potente de la α -manosidasa I, cifunensina (Ferrara et al., J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la ADCC
provocada por los anticuerpos GPRC5D pueden potenciarse, además, mediante
ciertas sustituciones en la Fc de los anticuerpos. Sustituciones ilustrativas son, por
ejemplo, sustituciones en las posiciones de aminoácidos 256, 290, 298, 312, 356,
330, 333, 334, 360, 378 o 430 (numeración de los residuos de acuerdo con el índice
EU) como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 6.737.056.

Métodos para detectar GPRC5D

En la presente descripción, se proporcionan métodos para detectar GPRC5D
en una muestra biológica al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o
fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente descripción. Como se
describe en la presente descripción, la muestra puede derivarse de orina, sangre,
suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células circulantes tumorales,
células que no se asocian a tejidos (*es decir*, células libres), tejidos (*p. ej.*, tejido
tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina),
preparaciones histológicas, y lo similar. En algunas modalidades, los métodos
descritos incluyen detectar GPRC5D en una muestra biológica al poner en contacto la
muestra con cualquiera de los anticuerpos específicos para GPRC5D o fragmentos de
unión al antígeno de estos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades la muestra puede ponerse en contacto con más de uno de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción. Por ejemplo, una muestra puede ponerse en contacto con un primer anticuerpo específico para GPRC5D, o fragmento de unión al antígeno de este, y después ponerse en contacto con un segundo anticuerpo específico para GPRC5D, o fragmento de unión al antígeno de este, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno no son el mismo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas modalidades, el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, puede fijarse a una superficie, tal como una placa de múltiples pocillos, chip, o sustrato similar antes de poner en contacto la muestra. En otras modalidades el primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, puede no fijarse, o unirse, a algo antes de poner en contacto la muestra.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos pueden marcarse de forma detectable. En algunas modalidades los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno marcados pueden facilitar la detección de GPRC5D a través de los métodos descritos en la presente descripción. Muchos de dichos marcadores son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los marcadores adecuados incluyen, pero no deben considerarse limitados a, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, etiquetas de epítomos, biotina, marcadores cromóforos, marcadores ECL, o enzimas. Más específicamente, los marcadores descritos incluyen reutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In - ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, polihistidina (etiqueta de HIS), colorantes de acridina, colorantes de

cianina, colorantes de fluorona, colorantes de oxazina, colorantes de fenantridina, colorantes de rodamina, colorantes de Alexafluor®, y lo similar.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D descritos pueden usarse en una variedad de ensayos para detectar GPRC5D en una muestra biológica. Algunos ensayos adecuados incluyen, pero no deben considerarse limitados a, análisis de western blot, radioinmunoensayo, resonancia de plasmones superficiales, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la detección de células GPRC5D que expresan cáncer en un sujeto puede usarse para determinar que el sujeto puede tratarse con un agente terapéutico dirigido contra GPRC5D.

GPRC5D está presente a niveles detectables en muestras de sangre y suero.

Por lo tanto, en la presente descripción se proporcionan métodos para detectar

GPRC5D en una muestra derivada de sangre, tal como una muestra de suero, al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a GPRC5D. La muestra de sangre, o derivados de esta, puede diluirse, fraccionarse, de cualquier otra manera procesarse para rendir una muestra a la que se le puede realizar el método descrito. En algunas modalidades, GPRC5D puede detectarse en una muestra de sangre, o un derivado de esta, mediante cualquier número de ensayos conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, análisis western blot, radioinmunoensayo, resonancia de plasmones superficiales, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión,

inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

Métodos para diagnosticar cáncer

5 En la presente descripción, se proporcionan métodos para diagnosticar cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye linfomas, tales como el mieloma múltiple (MM). En algunas modalidades, como se describe anteriormente, la detección de GPRC5D en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o una muestra de suero, proporciona la

10 capacidad para diagnosticar cáncer en el sujeto del que se obtuvo la muestra. Alternativamente, en algunas modalidades pueden usarse, además, otras muestras tales como una muestra histológica, una muestra de aspirado con aguja fina, tejido tumoral resecado, células circulantes, células tumorales circulantes, y lo similar, para evaluar si el sujeto del que se obtuvo la muestra tiene cáncer. En algunas modalidades, puede

15 conocerse que el sujeto del que se obtuvo la muestra tiene cáncer, pero el tipo de cáncer que afecta al sujeto puede no haberse diagnosticado aún o un diagnóstico preliminar puede ser poco claro; por lo tanto, la detección de GPRC5D en una muestra biológica obtenida de un sujeto puede permitir, o aclarar, el diagnóstico del cáncer. Por ejemplo, puede conocerse que un sujeto tiene cáncer, pero puede que no se conozca, o puede

20 ser poco claro, si el cáncer del sujeto es del que expresa GPRC5D.

 En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un sujeto está afectado con cáncer que expresa GPRC5D al determinar la cantidad de GPRC5D que se encuentra presente en una muestra biológica derivada del sujeto; y comparar la cantidad

observada de GPRC5D con la cantidad de GPRC5D en una muestra control, o de referencia, en donde una diferencia entre la cantidad de GPRC5D en la muestra derivada del sujeto y la cantidad de GPRC5D en la muestra control, o de referencia, es un indicio de que el sujeto está afectado con un cáncer que expresa GPRC5D. En otra modalidad, la

5 cantidad de GPRC5D observada en una muestra biológica obtenida de un sujeto puede compararse con niveles de GPRC5D conocidos por asociarse con ciertas formas o etapas de cáncer, para determinar la forma o etapa del cáncer del sujeto. En algunas modalidades se evalúa la cantidad de GPRC5D en la muestra derivada del sujeto al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une

10 inmuno-específicamente a GPRC5D, como los anticuerpos específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de GPRC5D puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, y células que no se asocian a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con

15 aguja fina, preparaciones histológicas, y lo similar. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye cánceres hematológicos, tales como el mieloma múltiple (MM). En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades el método para diagnosticar un cáncer que expresa GPRC5D implicará: poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un

20 anticuerpo específico para GPRC5D, o un fragmento de unión al antígeno de este (tales como los derivados de los anticuerpos y fragmentos proporcionados en la Tabla 1), cuantificar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra que se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, comparar la cantidad de GPRC5D presente

en la muestra con una muestra estándar o de referencia conocida; y determinar si los niveles de GPRC5D del sujeto entra dentro de los niveles de GPRC5D asociados con el cáncer. En una modalidad adicional, el método de diagnóstico puede seguirse con una etapa adicional de administrar o prescribir un tratamiento específico al cáncer. En otra modalidad, el método de diagnóstico puede seguirse con una etapa adicional de transmitir los resultados de la determinación para facilitar el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, el tratamiento específico contra el cáncer puede estar dirigido contra los cánceres que expresan GPRC5D, tales como los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un sujeto está afectado con cáncer que expresa GPRC5D al determinar la cantidad de GPRC5D que se encuentra presente en una muestra de sangre o suero obtenida del sujeto; y comparar la cantidad observada de GPRC5D con la cantidad de GPRC5D en una muestra control, o de referencia, en donde una diferencia entre la cantidad de GPRC5D en la muestra derivada del sujeto y la cantidad de GPRC5D en la muestra control, o de referencia, es un indicio de que el sujeto está afectado con un cáncer que expresa GPRC5D.

En algunas modalidades, la muestra control, o de referencia, puede derivarse de un sujeto que no está afectado con cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, la muestra control, o de referencia, puede derivarse de un sujeto que está afectado con cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, en donde la muestra control, o de referencia, se deriva de un sujeto que no está afectado con cáncer que expresa GPRC5D, un aumento observado en la cantidad de GPRC5D presente en la muestra de prueba, con relación al observado para la muestra control o de referencia,

es un indicio de que el sujeto en evaluación está afectado con cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, en donde la muestra control se deriva de un sujeto que no está afectado con cáncer que expresa GPRC5D, una disminución o similitud observada en la cantidad de GPRC5D presente en la muestra de prueba, con relación a la observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto en evaluación no está afectado con cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, cuando la muestra control o de referencia se deriva de un sujeto que está afectado con cáncer que expresa GPRC5D, una similitud observada en la cantidad de GPRC5D presente en la muestra de prueba, con relación a la observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto en evaluación está afectado con cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, cuando la muestra control o de referencia se deriva de un sujeto que está afectado con cáncer que expresa GPRC5D, una disminución observada en la cantidad de GPRC5D presente en la muestra de prueba, con relación a la observada para la muestra control o de referencia, es un indicio de que el sujeto en evaluación no está afectado con cáncer que expresa GPRC5D.

En algunas modalidades, la cantidad de GPRC5D en la muestra derivada del sujeto se evalúa al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a GPRC5D, tales como los anticuerpos descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de GPRC5D puede derivarse de una muestra de sangre, una muestra de suero, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos (*es decir*, células libres), tejidos (*p. ej.*, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar.

En varios aspectos, la cantidad de GPRC5D se determina al contactar la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. En algunas modalidades, la muestra puede contactarse por más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. En algunas modalidades, la muestra puede contactarse por un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D y, después, contactarse por un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D tales como los descritos en la presente descripción pueden usarse para esta capacidad.

Varias combinaciones de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para GPRC5D pueden usarse para proporcionar un “primer” y un “segundo” anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los métodos de diagnóstico descritos. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye linfomas, tales como el mieloma múltiple (MM).

En ciertas modalidades, la cantidad de GPRC5D se determina por análisis de Western blot, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

En varias modalidades de los métodos de diagnóstico descritos se usa una muestra control o de referencia. Esta muestra podría ser un control de ensayo positivo o negativo que asegura que el ensayo usado funciona adecuadamente; por ejemplo, un

control de ensayo de esta naturaleza podría usarse comúnmente para ensayos de inmunohistoquímica. Alternativamente, la muestra puede ser una referencia estandarizada para la cantidad de GPRC5D en una muestra biológica de un sujeto sano. En algunas modalidades, los niveles de GPRC5D observados del sujeto de prueba pueden compararse con los niveles de GPRC5D observados en muestras de sujetos conocidos por tener cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, el sujeto control puede afectarse con un cáncer de interés particular. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa temprana, que puede ser o no un cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa intermedia, que puede ser o no un cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, se conoce que el sujeto control tiene cáncer en etapa final, que puede ser o no un cáncer que expresa GPRC5D.

Métodos para monitorear cáncer

En la presente descripción se proporcionan métodos para monitorear el cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye linfomas, tales como el mieloma múltiple (MM). En algunas modalidades, los métodos descritos incluyen evaluar si un cáncer que expresa GPRC5D está progresando, retrocediendo o permaneciendo estable al determinar la cantidad de GPRC5D que se encuentra presente en una muestra biológica derivada del sujeto; y al comparar la cantidad observada de GPRC5D con la cantidad de GPRC5D en una muestra biológica obtenida, de una manera similar, del sujeto a un punto de tiempo anterior, en donde una diferencia entre la cantidad de GPRC5D en la

muestra de prueba y la muestra anterior proporciona un indicio de si el cáncer progresa, retrocede, o permanece estable. Con respecto a esto, una muestra de prueba con un aumento en la cantidad de GPRC5D, con relación a la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar progresión de un cáncer que expresa GPRC5D. Por el contrario, una muestra de prueba con una cantidad menor de GPRC5D, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar una regresión de un cáncer que expresa GPRC5D.

Consecuentemente, una muestra de prueba con una diferencia insignificante en la cantidad de GPRC5D, con relación a la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar un estado de enfermedad estable para un cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades la cantidad de GPRC5D en una muestra biológica derivada del sujeto se evalúa al poner en contacto la muestra con un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se une específicamente a GPRC5D, tales como los anticuerpos descritos en la presente descripción. La muestra evaluada para la presencia de GPRC5D puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no se asocian a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, los métodos para monitorear un cáncer que expresa GPRC5D implicará: poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo específico para GPRC5D, o fragmento de unión al antígeno de este (tales como los derivables de los anticuerpos y fragmentos proporcionados en la Tabla 1), cuantificar la

cantidad de GPRC5D presente en la muestra, comparar la cantidad de GPRC5D presente en la muestra a la cantidad de GPRC5D determinada a estar en una muestra biológica obtenida, de una manera similar, del mismo sujeto en un punto anterior en el tiempo; y determinar si varió el nivel de GPRC5D del sujeto en el tiempo. Una muestra de prueba con un aumento en la cantidad de GPRC5D, con relación a la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar progresión del cáncer. Por el contrario, una muestra de prueba con una cantidad menor de GPRC5D, en relación con la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar una regresión de un cáncer que expresa GPRC5D. Consecuentemente, una muestra de prueba con una diferencia insignificante en la cantidad de GPRC5D, con relación a la cantidad observada para la muestra anterior, puede indicar un estado de enfermedad estable para un cáncer que expresa GPRC5D. En algunas modalidades, los niveles de GPRC5D de la muestra pueden compararse a una muestra estándar o de referencia conocida, sola o en adición a los niveles de GPRC5D observados para una muestra evaluada en un punto anterior en el tiempo. En una modalidad adicional, el método de diagnóstico puede seguirse con una etapa adicional de administrar un tratamiento específico del cáncer. En algunas modalidades, el tratamiento específico para el cáncer puede estar dirigido contra los cánceres que expresan GPRC5D.

En varios aspectos, la cantidad de GPRC5D se determina al contactar la muestra con un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. En algunas modalidades, la muestra puede contactarse por más de un tipo de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. En algunas modalidades, la muestra puede contactarse por un primer anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D

y, después, contactarse por un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que une específicamente GPRC5D. Los anticuerpos tales como los descritos en la presente descripción pueden usarse para esta capacidad.

Varias combinaciones de los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno descritos en la Tabla 1 pueden usarse para proporcionar un “primer” y un “segundo” anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para llevar a cabo los métodos de monitoreo. En algunas modalidades el cáncer que expresa GPRC5D incluye un cáncer hematológico, tal como el mieloma múltiple (MM).

En ciertas modalidades, la cantidad de GPRC5D se determina por análisis de Western blot, radioinmunoensayo, inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

Estuches para detectar GPRC5D

En la presente descripción se proporcionan estuches para detectar GPRC5D en una muestra biológica. Estos estuches incluyen uno o más de los anticuerpos específicos para GPRC5D descritos en la presente descripción, o un fragmento de unión al antígeno de este, y las instrucciones para el uso del estuche.

El anticuerpo específico para GPRC5D proporcionado, o el fragmento de unión al antígeno, podría estar en solución; liofilizado; fijado a un sustrato, un portador o una placa; o marcado detectablemente.

Los kits descritos incluyen, además, componentes adicionales útiles para realizar los métodos descritos en la presente descripción. A manera de ejemplo, los kits pueden comprender los medios para obtener una muestra de un sujeto, una muestra control o de referencia, p. ej., una muestra de un sujeto que tiene un cáncer
 5 que progresa lentamente y/o un sujeto que no tiene cáncer, uno o más compartimientos de muestras, y/o el material de instrucción que describe la realización de un método de la invención y controles específicos o estándares.

Los medios para determinar el nivel de GPRC5D puede incluir, además, por ejemplo, reguladores y otros reactivos para el uso en un ensayo para determinar el nivel
 10 de GPRC5D. Las instrucciones pueden ser, por ejemplo, instrucciones impresas para realizar el ensayo y/o instrucciones para evaluar el nivel de expresión de GPRC5D.

Los kits descritos pueden incluir, además, los medios para aislar una muestra de un sujeto. Estos medios pueden comprender uno o más artículos de equipamiento o reactivos que pueden usarse para obtener un fluido o tejido de un sujeto. Los
 15 instrumentos para obtener una muestra de un sujeto pueden comprender, además, los medios para aislar componentes de la sangre, tal como suero, de una muestra de sangre. Preferentemente, el kit se designa para el uso con un sujeto humano.

Anticuerpos multiespecíficos

20 Los dominios de unión de los anticuerpos anti-GPRC5D descritos en la presente descripción reconocen células que expresan GPRC5D en la superficie. Como se indica anteriormente, la expresión de GPRC5D puede ser indicativo de una célula cancerosa. Puede lograrse la orientación más específica a los subconjuntos de células al producir

moléculas biespecíficas, tales como los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que se unen a GPRC5D y a otro objetivo, tal como CD3 y BCMA. Esto se logra al producir una molécula que comprende una primera región de unión a GPRC5D y una segunda región de unión al antígeno adicional. Las regiones de unión al antígeno pueden tener cualquier forma que permita el reconocimiento específico del objetivo, por ejemplo, la región de unión puede ser o puede incluir un dominio variable de cadena pesada, un Fv (combinación de un dominio de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera), un dominio de unión basados en un dominio de fibronectina tipo III (tal como de fibronectina, o a base de un consenso de los dominios tipo III de fibronectina, o de tenascina o a base de un consenso de los dominios tipo III de tenascina, tales como las moléculas de Centyrin de Janssen Biotech, Inc., ver, *p. ej.*, las patentes núm. WO2010/051274 y WO2010/093627). En consecuencia, se proporcionan moléculas biespecíficas que comprenden dos regiones de unión al antígeno diferentes que se unen a GPRC5D y a otro antígeno, respectivamente.

Algunos de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente descripción comprenden dos regiones de unión al antígeno diferentes que se unen a GPRC5D y a CD3, respectivamente. En modalidades preferidas, se proporcionan los anticuerpos multiespecíficos que se unen a GPRC5D y a CD3 (anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3) y fragmentos multiespecíficos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 comprende una primera cadena pesada (HC1) y una primera cadena ligera (LC1) que se emparejan para formar un primer sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a GPRC5D y una segunda cadena pesada (HC2) y una segunda cadena ligera (LC2) que

se emparejan para formar un segundo sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a CD3. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 es un anticuerpo biespecífico que comprende un brazo específico para GPRC5D que comprende una primera cadena pesada (HC1) y una primera cadena ligera (LC1) que se emparejan para formar un primer sitio de unión al antígeno que se une específicamente a CD3 y un brazo específico para CD3 que comprende una segunda cadena pesada (HC2) y una segunda cadena ligera (LC2) que se emparejan para formar un segundo sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a GPRC5D. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen los anticuerpos que tienen una estructura de anticuerpo en toda su extensión. Un “anticuerpo en toda su extensión”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas del anticuerpo en toda su extensión y dos cadenas ligeras del anticuerpo en toda su extensión. Una cadena pesada completa (HC) del anticuerpo incluye los dominios variables y constantes de la cadena pesada VH, CH1, CH2, y CH3. Una cadena ligera del anticuerpo en toda su extensión (LC) incluye los dominios variables y constantes de la cadena ligera VL y CL. El anticuerpo en toda su extensión puede carecer de la lisina (K) del extremo C-terminal lo mismo en una que en ambas cadenas pesadas. El término “brazo Fab” o “media molécula” se refiere a una pareja cadena pesada-cadena ligera que se une específicamente a un antígeno. En algunas modalidades, uno de los dominios de unión al antígeno es un dominio de unión que no se basa en un anticuerpo, *p. ej.*, un dominio de unión que se basa en un dominio de fibronectina tipo 3, *p. ej.*, Centyrin.

El brazo de unión a GPRC5D de los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en la presente descripción pueden derivarse a partir de cualquiera de los anticuerpos específicos para GPRC5D descritos anteriormente. En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende una CDR1 de cadena pesada, CDR2 y CDR3 derivadas de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende la CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, derivadas de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades ilustrativas de los brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que une GPRC5D comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del clon GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597.

En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del clon GC5B81, GC5B465, GS5B483 o GC5B596. En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende un dominio variable de cadena pesada derivada de un clon del anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de

cadena ligera derivada de un clon de anticuerpo como se describe en la Tabla 1. En algunas modalidades ilustrativas de tales brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que se une a GPRC5D comprende el dominio de cadena pesada variable del clon GC5B81, GC5B465, GS5B483 o GC5B596. En algunas

5 modalidades ilustrativas de los brazos de unión a GPRC5D, la primera región de unión al antígeno que une GPRC5D comprende dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera del clon GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, o GC5B597.

10 La Tabla 3 proporciona una lista de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 que tienen un par de cadena pesada y ligera específico para GPRC5D y otro par de cadena pesada y ligera específico para CD3, en donde la ident. del anticuerpo en particular se enumera para describir los brazos del anticuerpo específico del antígeno que se usan para producir la modalidad descrita.

15 **Tabla 3:**

20

Brazo específico para GPRC5D = ID del Ab	Brazo específico para CD3 = ID del Ab
GC5B81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GC5B483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GC5B382	CD3B219
GC5B379	CD3B219
GC5B373	CD3B219
GC5B376	CD3B219
GC5B385	CD3B219
GC5B370	CD3B219

Brazo específico para GPRC5D = ID del Ab	Brazo específico para CD3 = ID del Ab
GC5B602	CD3B219
GC5B603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GC5B601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

En algunas modalidades de los anticuerpos biespecíficos, el brazo de unión a GPRC5D se une, además, a GPRC5D de cynomolgus, preferentemente, el dominio extracelular de estos.

En algunas modalidades, el brazo de unión a GPRC5D del anticuerpo multiespecífico es IgG, o un derivado de esta, por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En algunas modalidades, en donde el brazo de unión a GPRC5D tiene un isotipo IgG4, este contiene sustitución(es) de S228P, L234A y L235A en su región Fc.

En algunas modalidades de los anticuerpos biespecíficos, el segundo brazo de unión a antígeno se une a CD3 humano. En algunas modalidades preferidas, el brazo específico a CD3 el anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 se deriva de anticuerpo específico para CD3 que se une y activa las células T primarias humanas y/o las células T primarias de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se une a un epítipo en el N-terminal de CD3ε. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 se pone en contacto un epítipo que incluye los seis aminoácidos N-terminal de CD3ε. En algunas modalidades, el brazo de unión específico a CD3 del anticuerpo biespecífico se deriva del anticuerpo monoclonal SP34 en ratón, un isotipo IgG3/lambda en ratón. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 comprende las CDR del anticuerpo SP34.

Tales brazos de unión a CD3 pueden unirse a CD3 con una afinidad de $5 \times 10^{-7} \text{M}$ o menor, tal como $1 \times 10^{-7} \text{M}$ o menor, $5 \times 10^{-8} \text{M}$ o menor, $1 \times 10^{-8} \text{M}$ o menor, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ o menor, o $1 \times 10^{-9} \text{M}$ o menor. El brazo de unión específico a CD3 puede ser una versión humanizada de un brazo del anticuerpo monoclonal SP34 de ratón. El marco de adaptación humana (HFA) puede usarse para humanizar el anticuerpo anti-CD3 del que se deriva el brazo específico a CD3. En algunas modalidades de los anticuerpos biespecíficos, el brazo de unión a CD3 comprende un par de cadena pesada y de cadena ligera seleccionado de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 es IgG, o un derivado de esta. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3 es IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En algunas modalidades, en donde el brazo de unión a CD3 tiene un isotipo IgG4, este contiene las sustituciones S228P, L234A, L235A, F405L, y R409K en su región Fc. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ sobre las células T humanas primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ sobre las células T de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a CD3 ϵ sobre células T humanas y de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno activan las células T CD3+ humanas primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno activan las células T CD4+ de cynomolgus primarias.

En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a GPRC5D que comprende una cadena pesada del clon de los anticuerpos GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603,

GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a GPRC5D que comprende una cadena pesada y una cadena ligera del clon de los anticuerpos GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373,

5 GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada del clon de anticuerpo CD3B219. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a

10 CD3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera del clon de anticuerpo CD3B219. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a GPRC5D que comprende una cadena pesada del clon de anticuerpo GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603,

15 GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597 y un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada del clon de anticuerpo CD3B219. En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 que tiene un brazo de unión a GPRC5D que comprende una cadena pesada y una cadena ligera del clon de anticuerpo GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382,

20 GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 o GC5B597 y un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera del clon de anticuerpo CD3B219.

Un ejemplo de un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 se proporciona en la Tabla 23.

Se han descrito formatos diferentes de anticuerpos biespecíficos y se publicaron recientemente por Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cuerpo cruzado, o un anticuerpo biespecífico obtenido a través de un intercambio de brazo Fab controlado como los descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; moléculas de
 10 orientación doble similares a IgG recombinantes, en donde los dos lados de la molécula contienen, cada uno, el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión a IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a un fragmento Fab extra o partes del fragmento Fab; moléculas de fusión a Fc, en donde las moléculas Fv de cadena sencilla o diacuerpos
 15 estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión a Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos basados en ScFv y diacuerpos, y de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos), en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de
 20 dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula portadora.

En algunas modalidades, las moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios incluyen Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), botón-en-ojal (Genentech), CrossMAbs (Roche) y pareados electrostáticamente

(Amgen), LUZ-Y (Genentech), cuerpo de dominio manipulado de intercambio de hebras (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

En algunas modalidades, las moléculas de doble orientación similares a IgG-recombinante incluyen Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis), Two-in-one Antibody (Genentech), Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a IgG incluyen dominio variable doble (DVD)-Ig (Abbott), biespecífico de tipo IgG (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a Fc incluyen a ScFv/Fc Fusions (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) y Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine--China).

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de fusión a Fab incluyen F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotechnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos de dominio basados en ScFv, diacuerpos incluyen, pero no se limitan a, Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet), Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble orientación (Ablynx), anticuerpos de dominio solo de cadena pesada de orientación doble.

Los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención pueden generarse, por ejemplo, mediante el uso del intercambio de brazos Fab (o intercambio de medias moléculas) entre dos anticuerpos bivalentes específicos al introducir sustituciones en la interfase de CH3 en cada media molécula para favorecer la formación de

5 heterodímeros de dos medias moléculas de anticuerpos que tienen distinta especificidad lo mismo en un ambiente libre de células in vitro que mediante el uso de coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y la disociación-asociación de dominios CH3. Los puentes disulfuro de la cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales

10 se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y se reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden diseñarse para favorecer la

15 heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas cada una de las cuales se une a un epítipo distinto, es decir, un epítipo sobre GPRC5D y un epítipo sobre el CD3.

La “homodimerización”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de

20 CH3 idénticas. Un “homodímero”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas.

La “heterodimerización”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas. Un “heterodímero”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con

5 secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas.

La estrategia “botón-en-ochal” (ver, p. ej., de la patente núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos en toda su extensión. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfase de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en las posiciones que afectan las interacciones de los dominios

10 CH3 para promover la formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ochal) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (botón) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un

15 heterodímero como un resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un “ochal” con la cadena pesada con un “botón”. Los pares de sustituciones de CH3 ilustrativas que forman un botón son (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): T366Y/F405A, T366W/ F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T,

20 T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas mediante el uso de interacciones electrostáticas al sustituir residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados negativamente

en una segunda superficie de CH3, como se describe en la publ. de patente de los EE.

UU. núm. US2010/0015133; publ. de patente de los EE. UU. núm. US2009/0182127;

publ. de patente de los EE. UU. núm. US2010/028637 o publ. de patente de los EE.

UU. núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede

5 promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas como la posición modificada

en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el

segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405AY407V/T394W,

T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V,

L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, o

10 T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la

publ. de patente de los EE. UU. núm. US2012/0149876 o publ. de patente de los EE.

UU. núm. US2013/0195849.

Además de los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos biespecífico de la invención pueden generarse in vitro en un ambiente libre de células al introducir

15 mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos

monoespecíficos y formar el anticuerpo heterodimérico biespecífico a partir de dos

anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones reductoras

para permitir la isomerización de enlaces disulfuro de acuerdo con los métodos

descritos en la publ. de patente núm. W02011/131746; En los métodos, el primer

20 anticuerpo bivalente monoespecífico (por ejemplo, anticuerpo anti-GPRC5D) y el

segundo anticuerpo bivalente monoespecífico (por ejemplo, anticuerpo anti-CD3) se

diseñan para tener ciertas sustituciones en el dominio CH3 que promuevan la

estabilidad del heterodímero; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones

reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlaces disulfuro; lo que genera así el anticuerpo biespecífico por intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restablecerse de forma óptima a condiciones no reductoras. Los agentes reductores
5 ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), glutatión, tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol y tris (2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, puede usarse la incubación por lo menos 90 min a una temperatura de al menos
10 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

Además de los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos, además se presentan secuencias de polinucleótidos capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 descritos. Además, en la presente descripción se
15 presentan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos, así como células que expresan los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3. Además, se describen las células capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de insecto (tales como Sf7), células de levadura, células de plantas, o células bacterianas (tal como *E. coli*).
20 Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células híbridomas.

Composición terapéutica y métodos para el tratamiento mediante el uso de anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos de estos

Los anticuerpos biespecíficos para GPRC5D descritos anteriormente, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 descritos anteriormente, son útiles en la terapia. Particularmente, los anticuerpos biespecíficos para GPRC5D son útiles en el tratamiento del cáncer. Además, en la presente invención se proporcionan composiciones terapéuticas para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno multiespecífico descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. En una modalidad dicha composición farmacéutica es para el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D, que incluye (pero sin limitare a) lo siguiente: cánceres de células B que expresan GPRC5D, tales como el mieloma múltiple (MM); y otros cánceres que todavía restan determinar en los cuales se expresa GPRC5D. Los anticuerpos biespecíficos particulares que pueden usarse para tratar el cáncer, tal como el cáncer hematológico, que incluyen los cánceres específicos discutidos anteriormente, incluyen los anticuerpos GC5B81, GC5B465, GS5B483 o GC5B596.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción comprenden: a) una cantidad eficaz de un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la presente invención, y b) un portador farmacéuticamente aceptable, que puede estar inerte o activo fisiológicamente. En modalidades preferidas, el

5 anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. Como se usa en la presente descripción, el término

10 “portadores farmacéuticamente aceptables” incluye cualquiera de y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, y lo similar, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes incluyen uno o más de agua, salina, salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y lo similar, así como además cualquier combinación de

15 estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición. Particularmente, los ejemplos relevantes de portador adecuado incluyen: (1) salina regulada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina sérica humana, (2) 0,9 % de salina (0,9 % p/v de

20 cloruro de sodio (NaCl)), y (3) 5 % (p/v) de dextrosa; y podría contener, además, un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20®.

Las composiciones de la presente descripción pueden contener, además, un agente terapéutico adicional, cuando sea necesario para el trastorno particular que se

trata. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico y el compuesto activo complementario tendrán actividades complementarias que no afectan adversamente uno a otro. En una modalidad preferida, el agente terapéutico adicional es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina o interleucina 2. En una
5 modalidad preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico.

Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas, y sólidas, pero la forma preferida depende del modo de administración destinado y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones
10 inyectables o infusibles. El modo de administración preferido es por vía parenteral (p. ej., por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea). En una modalidad preferida, las composiciones de la invención se administran de forma intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En otra modalidad preferida, se inyectan por vías intramusculares, subcutáneas, intraarticulares,
15 intrasinoviales, intratumorales, peritumorales, intralesionales, o perilesionales, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como además sistémicos.

Las composiciones estériles para administración parenteral pueden prepararse al incorporar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o anticuerpo conjugado de la presente invención en la cantidad requerida en un solvente adecuado, seguido por la
20 esterilización mediante la microfiltración. Como solvente o vehículo, puede usarse agua, salina, salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y lo similar, así como además combinación de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro de sodio en la composición.

Estas composiciones pueden contener, además, adyuvantes, particularmente agentes humectantes, isotonizantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral pueden prepararse, además, en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el tiempo para el uso en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico puede administrarse, además, oralmente. Como composiciones sólidas para la administración oral, pueden usarse tabletas, píldoras, polvos (cápsulas de gelatina, sobres) o gránulos. En estas composiciones, el ingrediente activo de acuerdo con la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes, tal como almidón, celulosa, sucrosa, lactosa o sílice, bajo una corriente de argón. Estas composiciones pueden comprender, además, sustancias diferentes a los diluyentes, por ejemplo, uno o más lubricantes, tal como estearato de magnesio o talco, un colorante, un revestimiento (tableta revestida con azúcar) o un barniz.

Como composiciones líquidas para administración oral, pueden usarse soluciones farmacéuticamente aceptables, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender sustancias diferentes a diluyentes, por ejemplo, productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saborizantes o estabilizantes.

Las dosis dependen del efecto deseado, la duración del tratamiento y la ruta de administración usada; generalmente, se encuentran entre 5 mg y 1000 mg por día oralmente para un adulto con dosis únicas en el intervalo de 1 mg a 250 mg de sustancia activa. Generalmente, el médico determinará la dosificación adecuada dependiendo de la edad, peso y algunos otros factores específicos al sujeto a tratar.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para matar una célula GPRC5D+ al administrar a un paciente necesitado de este un anticuerpo multiespecífico que se une a dicho GPRC5D y es capaz de reclutar las células T para matar dicha célula GPRC5D+ (es decir, redirección de células T). Puede usarse de manera terapéutica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo multiespecíficos de la invención. Por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo GPRC5D x CD3-multiespecífico puede usarse terapéuticamente para tratar el cáncer en un sujeto.

En una modalidad preferida, se usan los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos multiespecíficos de la invención para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una modalidad más preferida, una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, y que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico de la invención, se usa para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero. En una modalidad, el trastorno es un cáncer.

Particularmente, el cáncer es un cáncer que expresa GPRC5D, que incluye (pero sin limitarse a) lo siguiente: cánceres de células B que expresan GPRC5D, tales como el mieloma múltiple (MM); y otros cánceres que todavía restan determinar en los cuales se expresa GPRC5D. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este.

En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de una variedad de cánceres, que incluyen (pero sin

limitarse a) lo siguiente: un cáncer que expresa GPRC5D, que incluye (pero sin limitarse a) los siguientes: cánceres de células B/plasmáticas que expresan GPRC5D, tal como mieloma múltiple (MM) agudo o mielomas premalignos tales como gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, por sus siglas en inglés) y

5 mieloma múltiple quiescente (SMM, por sus siglas en inglés) y plasmacitoma; y otros cánceres que todavía restan determinar en los cuales se expresa GPRC5D.

Similarmente, se proporciona, además, en la presente descripción un método para inhibir el crecimiento de las poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto las células objetivo que expresan GPRC5D, o un tejido que contiene tales células

10 objetivo, con una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico de la presente invención, ya sea solo o en combinación con otros agentes citotóxicos o terapéuticos, en presencia de una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un

15 fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. En una modalidad preferida, el agente terapéutico adicional es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina o interleucina 2. En una modalidad preferida, el agente

20 terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. El método para inhibir el crecimiento de las poblaciones celulares seleccionadas puede practicarse *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente a fin de matar las células enfermas o

malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante a fin de matar las células T competentes y evitar la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés); tratamientos de cultivos celulares a fin de matar todas las células excepto para variantes deseadas que no expresan el antígeno destino; o de matar variantes que expresan el antígeno indeseado. Las condiciones del uso *in vitro* que no es clínico se determinan rápidamente por un experto en la técnica.

Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son remover las células tumorales de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer. El tratamiento puede llevarse a cabo como sigue. Se toma la médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se le añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 uM a 1 uM, por aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 °C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, se determinan fácilmente por un experto en la técnica. Después de la incubación se lavan las células de médula ósea con medio que contiene suero y se regresan al paciente mediante infusión i.v. de acuerdo con los métodos conocidos. En circunstancias en donde el paciente recibe otro tratamiento tal como un plan de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo entre el tiempo de recogida de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido mediante el uso de equipamiento médico estándar.

Para el uso clínico *in vivo*, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico se administra a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos GPRC5D x CD3 y fragmentos

multiespecíficos de unión al antígeno de estos pueden ser útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa GPRC5D en un sujeto que los necesite. En algunas modalidades, el cáncer que expresa GPRC5D es un cáncer de células B, tal como el mieloma múltiple (MM). En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo

5 multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el paciente es un mamífero, preferentemente, un ser humano. En algunas
10 modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno multiespecífico se administrará como una solución que se ha probado para esterilidad.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamientos y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden
15 administrarse varias dosis divididas durante un período de tiempo o puede reducirse o incrementar la dosis proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación.

Las dosificaciones y los regímenes de dosificaciones eficientes para o
20 anticuerpos y fragmentos multiespecíficos dependen de la enfermedad o afección a tratar y puede determinarse por un experto en la técnica. Un intervalo ilustrativo, no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es aproximadamente 0,001-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-

5 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001-2 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-1 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1 o aproximadamente 10 mg/kg.

Un médico o veterinario con experiencia en la técnica puede determinar y

5 prescribir rápidamente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar las dosis del anticuerpo o fragmento multiespecífico empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos con el objetivo de alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente las dosificaciones hasta que se alcance el efecto deseado. Generalmente,

10 una dosis adecuada diaria de un anticuerpo biespecífico de la presente invención será la cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración puede ser, p. ej., parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse mediante infusión en una dosificación semanal calculada por

15 mg/m^2 . Tales dosificaciones pueden basarse, por ejemplo, en los mg/kg de las dosificaciones proporcionadas anteriormente de acuerdo con lo siguiente: dosis $(\text{mg/kg}) \times 70$: 1.8. Tal administración puede repetirse, por ejemplo, 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 h, tal como de 2 a 12 h. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento

20 multiespecífico puede administrarse mediante infusión continua lenta durante un largo período, tal como más de 24 h, con el objetivo de reducir los efectos tóxicos secundarios.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse en una dosificación semanal de calculada como una dosis fijada por más de ocho veces,

tal como de cuatro a seis veces cuando se da una vez por semana. Tal régimen puede repetirse una o más veces como sea necesario, por ejemplo, después de seis o doce meses. Tales dosificaciones fijadas pueden, por ejemplo, basarse en las dosificaciones en mg/kg proporcionadas anteriormente, con un peso corporal estimado de 70 kg. La

5 dosificación puede determinarse o ajustarse al medir la cantidad de anticuerpo biespecífico de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, al tomar una muestra biológica y al usar anticuerpos antiidiotipos que se dirigen a la región de unión al antígeno GPRC5D de los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento multiespecífico puede
10 administrarse mediante la terapia de mantenimiento, tal como, p. ej., una vez a la semana por un período de seis meses o más.

Un anticuerpo o fragmento multiespecífico puede administrarse, además, profilácticamente con el objetivo de reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de la ocurrencia de un evento en la progresión del cáncer, y/o reducir el
15 riesgo de recurrencia cuando el cáncer está en remisión.

Los anticuerpos o fragmentos multiespecíficos de estos como se describe en la presente descripción pueden administrarse, además, en terapia de combinación, es decir, combinada con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección a tratar. En consecuencia, en una modalidad, el medicamento que contiene
20 el anticuerpo es para la combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el otro agente terapéutico es citarabina, una antraciclina, dihidrocloruro de histamina, o interleuquina 2. Tal administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial, en

cualquier orden. Para la administración simultánea los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según se adecue.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar un trastorno que implica células que expresan GPRC5D en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción, y la radioterapia a un sujeto que necesita de esta. En una modalidad se proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento multiespecífico, tal como un anticuerpo GPRC5D x CD3 descrito en la presente descripción, y la radioterapia a un sujeto con necesidad de esta. Se proporciona la radioterapia, que puede comprender radiación o administración asociada de productos radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se trata (el tratamiento con radiación puede, por ejemplo, estar en forma de terapia de radiación de haz externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radioactivos que pueden usarse para poner en práctica tales métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131, e indio-111.

Kits

Además, en la presente descripción se proporcionan incluye estuches, por ejemplo, que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este multiespecífico descrito y las instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmentos para matar los tipos de células particulares. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un

anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. Las instrucciones
 5 pueden incluir las indicaciones para usar el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este in vitro, in vivo o ex vivo.

Típicamente, el estuche tendrá un compartimento que contiene el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este. El anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este puede estar en una forma liofilizada,
 10 forma líquida, u otra forma modificable para incluirla en un estuche. El estuche puede contener, además, elementos adicionales necesarios para poner en práctica el método descrito en las instrucciones en el estuche, tal como una solución esterilizada para reconstituir un polvo liofilizado, agentes adicionales para combinar con el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este para administrar
 15 el anticuerpo o fragmento multiespecífico de unión al antígeno de este a un paciente.

Usos para el diagnóstico

Los anticuerpos o fragmentos multiespecíficos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para propósitos de diagnóstico. Por lo tanto, se proporcionan,
 20 además, composiciones para el diagnóstico que comprenden un anticuerpo o fragmentos multiespecíficos como se define en la presente descripción, y para sus usos. En modalidades preferidas, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico GPRC5D x CD3 como se describe en la presente descripción, o un fragmento

multiespecífico de unión al antígeno de este y, más preferentemente, a anticuerpo
 biespecífico GPRC5D x CD3 como el descrito en la presente descripción, o un fragmento
 biespecífico de GPRC5D x CD3 de unión al antígeno de este. En una modalidad, la
 presente invención proporciona un estuche para el diagnóstico del cáncer que comprende
 5 un recipiente que comprende un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3, y uno o más
 reactivos para detectar la unión del anticuerpo a GPRC5D. Los reactivos pueden incluir,
 por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas, u otras etiquetas detectables.
 Los reactivos pueden incluir, además, anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para
 reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que
 10 puede visualizarse. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente
 descripción, o fragmentos de unión al antígeno de estos, pueden marcarse con un
 radiomarcador, un marcador fluorescente, una etiqueta de epítomos, biotina, un marcador
 cromóforo, un marcador ECL, una enzima, rutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -ácido
 dietilenetriaminepentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-
 15 galactosidasa, o polihistidina o similar a tales marcadores conocidos en la técnica.

MODALIDADES

La descripción proporcionada en la presente descripción también provee las
 siguientes modalidades no limitantes.

- 20 1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une
 específicamente a GPRC5D que comprende:
 - a. una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena pesada
 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de

cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9;

5 b. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10;

10 c. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11;

15 d. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12;

 e. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 61, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72;

20 f. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30;

g. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73;

5 h. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11;

10 i. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 62, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74;

15 j. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 63, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 69 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75;

20 k. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 64, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12;

l. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 76; o

m. una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 77.

2. El anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno de la modalidad 1, en donde:

a. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19;

b. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que

tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19;

c. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;

d. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21;

e. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 61, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia

de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 78 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80;

5 f. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que
10 tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19;

g. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29 y dicha
15 CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;

20 h. dicho anticuerpo comprende dicha cadena pesada de CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.: 11 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;

5 i. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 62, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia
10 de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;

 j. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 63, dicha CDR2 de cadena
15 pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 69 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 78 y una CDR3 de
20 cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80;

 k. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 61, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67 y dicha

CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 78 y una CDR3 de

5 cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80;

l. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de

10 ident.: 76 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 95, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 79 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 81; o

m. dicho anticuerpo comprende dicha CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66, dicha CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71 y dicha CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 77 comprende, además, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, una CDR2 de cadena ligera que

20 tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21.

3. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno de este, que se une específicamente a GPRC5D, y que comprende una región de cadena pesada variable

(VH) seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o 91.

4. El anticuerpo de la modalidad 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

5 de este comprende una región de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 56, 57, 58, 92, 93 o 94.

5. El anticuerpo de la modalidad 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

de este comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en las sec.

10 con núms.

de ident.: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 91 y una región VL seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 56, 57, 58, 92, 93 o 94.

6. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende las sec. con núms. de ident.: 52, 53 u 83 pareadas con una región de cadena VL que

15 comprende la sec. con núm. de ident.: 56.

7. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende las sec. con núms. de ident.: 54, 84, 85, 86 o 90 pareadas con una región de cadena VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 57.

8. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende

20 las sec. con núms. de ident.: 55 u 88 pareadas con una región de cadena VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 58.

9. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende las sec. con núms. de ident.: 82 u 87 pareadas con una región de cadena VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 92.
10. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende
5 la sec. con núm. de ident.: 89 pareada con una región de cadena VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 93.
11. El anticuerpo de la modalidad 5, en donde la región de cadena VH comprende la sec. con núm. de ident.: 91 pareada con una región de cadena VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 94.
- 10 12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 11, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22.
13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las
15 modalidades 1 a 12, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno humano.
14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es recombinante.
- 20 15. El fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, un fragmento Fab2 o un anticuerpo de cadena única.

16. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 15, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
17. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las
5 modalidades 1 a 9 es un isotipo IgG1 o IgG4.
18. El anticuerpo de la modalidad 17, en donde la IgG1 tiene una sustitución K409R en su región Fc.
19. El anticuerpo de la modalidad 17, en donde la IgG1 tiene una sustitución F405L en su región Fc.
- 10 20. El anticuerpo de la modalidad 20, en donde la IgG4 tiene una sustitución F405L y una sustitución R409K en su región Fc.
21. El anticuerpo de la modalidad 16, que comprende, además, una sustitución S228P, una sustitución L234A y una sustitución L235A en su región Fc.
22. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las
15 modalidades 1 a 14, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une específicamente a GPRC5D humano y reacciona de manera cruzada con GPRC5D de mono cynomolgus.
23. El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 17, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno induce
20 ADCC *in vitro* con EC₅₀ de menos de aproximadamente 28 nM.
24. Una célula aislada que expresa el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 11.
25. La célula de la modalidad 24, en donde la célula es una hibridoma.

26. La célula de la modalidad 24, en donde el anticuerpo se produce de manera recombinante.

27. Un anticuerpo GPRC5D-R α x CD3 aislado biespecífico que comprende:

a) una primera cadena pesada (HC1);

5 b) una segunda cadena pesada (HC2);

c) una primera cadena ligera (LC1); y

d) una segunda cadena ligera (LC2),

en donde, la HC1 y la LC1 se aparean para formar un primer sitio de unión al

antígeno que se une específicamente a CD3, y la HC2 y la LC2 se aparean para

10 formar un segundo sitio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D, o un fragmento de unión biespecífico GPRC5D x CD3 de este.

28. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 27, en donde HC1 comprende la sec. con núm. de ident.: 25 y LC1 comprende la sec. con núm. de ident.: 26.

15 29. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 52 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 56.

30. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 53 y LC2
20 comprende la sec. con núm. de ident.: 56.

31. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 54 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 57.

32. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 55 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 58.
33. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico
5 de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 82 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 92.
34. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 83 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 56.
- 10 35. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 84 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 57.
36. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 85 y LC2
15 comprende la sec. con núm. de ident.: 57.
37. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 86 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 57.
38. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico
20 de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 87 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 92.

39. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 88 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 58.
40. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 89 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 93.
41. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 91 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 94.
42. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de la modalidad 28, en donde HC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 85 y LC2 comprende la sec. con núm. de ident.: 57.
43. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífico son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
44. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífica de la modalidad 43, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífica es el isotipo IgG4.
45. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífica de las modalidades 27 a 42, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífica de este se une a GPRC5D en la superficie de las células de mieloma humano.
46. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífica de las modalidades 27 a 42, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífica de este se une a GPRC5D en la superficie de las células de mieloma múltiple humano.

47. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífica de las modalidades 27 a 42, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífica induce la activación in vitro de células T humanas con una EC_{50} menor que aproximadamente 0,22 nM.
- 5 48. El anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de las modalidades 27 a 42, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífico induce la citotoxicidad in vitro dependiente de células T de células que expresan GPRC5D con una EC_{50} de menos de aproximadamente 0,89 nM.
49. Una célula aislada que expresa el anticuerpo o fragmento de unión biespecífica
10 de una cualquiera de las modalidades 27 a 42.
50. La célula de la modalidad 49, en donde la célula es una hibridoma.
51. La célula de la modalidad 49, en donde el anticuerpo o fragmento de unión biespecífico se produce de manera recombinante.
52. Un método para tratar un sujeto que tiene cáncer, dicho método comprende:
15 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42 a un paciente en necesidad de este durante un periodo de tiempo suficiente para tratar el cáncer.
53. Un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas, dicho
20 método comprende:
administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42 para inhibir el crecimiento o proliferación de células de cáncer.

54. Un método de redireccionar una célula T a una célula de cáncer que expresa GPRC5D, dicho método comprende:

administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42 para redireccionar una célula T a un cáncer.

55. El método de la modalidad 52, 53, o 54, en donde el cáncer es un cáncer hematológico.

56. El método de la modalidad 55, en donde el cáncer hematológico es un cáncer de células B que expresan GPRC5D.

57. El método de la modalidad 56, en donde el cáncer de células B que expresan GPRC5D es el mieloma múltiple.

58. El método de la modalidad 52, que comprende administrar un segundo agente terapéutico.

59. El método de la modalidad 58, en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una terapia anticáncer dirigida.

60. El método de la modalidad 59, en donde el agente quimioterapéutico es citarabina, una antraciclina, diclorhidrato de histamina, o interleuquina 2.

61. El método de la modalidad 59, en donde el segundo agente terapéutico se administra a dicho sujeto simultáneamente con, secuencialmente, o separadamente del anticuerpo biespecífico.

62. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42 y un portador farmacéuticamente aceptable.

63. Un método para generar el anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42 mediante el cultivo de la célula de una cualquiera de las modalidades 49 a 51.

64. Un polinucleótido sintético aislado que codifica la HC1, la HC2, la LC1 o la LC2 del anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífico de una cualquiera de las modalidades 27 a 42.

65. Un estuche que comprende el anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 o fragmento de unión biespecífica como se definió en una cualquiera de las modalidades 27 a 42 y/o un polinucleótido como se definió en la modalidad 63, y un envasado para el mismo.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para complementar la descripción anterior y para proporcionar un mejor entendimiento del asunto del sujeto descrito en la presente descripción. Estos ejemplos no deben considerarse limitantes del asunto del sujeto descrito. Debe entenderse que los ejemplos y modalidades descritas en la presente descripción son solo para propósitos ilustrativos y que varias modificaciones o cambios en la luz de estos serán aparentes a los expertos en la técnica y están para incluirlos dentro de, y puede hacerse sin salirse de, el verdadero alcance de la invención.

EJEMPLO 1: ANTÍGENOS

Debido a las dificultades en la producción de antígenos GPRC5D recombinantes, se generó líneas celulares transfectadas que muestran GPRC5D [humano (sec. con núm. de ident.: 22), de cyno (sec. con núm. de ident.: 23) y murina (sec. con núm. de

ident.: 24)] con métodos estándar que se usarán como antígenos de células enteras para la generación de anticuerpos y estudios de caracterización (Tabla 4).

Tabla 4. Líneas celulares que expresan GPRC5D

5	Proteína	Línea celular	Promotor	Resistencia
	GPRC5D humano	HEK293T	CMV	Neomicina
	GPRC5D de cyno	HEK293F	CMV	Blasticidina

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS GPRC5D MEDIANTE EXHIBICIÓN DE FAGOS

- 10 Se siguieron dos enfoques diferentes en la generación de anticuerpos GPRC5D por fagos: paneo de células estándar (selección negativa) y paneo de fagos celulares por FACS (selección competitiva).

Paneo de fagos celulares estándar (selección negativa):

- 15 Se describieron detalladamente genotecas de fagos de novo internas (Shi et al. (2010) J. Mol. Biol. 397:385-396; la publicación de la patente internacional núm. WO09/085462). Estas genotecas se construyeron sobre tres genes de línea germinal VH humanos (IGHV1-69, 3-23, 5-51) y cuatro genes de línea germinal VL humanos (A27, B3, L6, O12) diseñados para tener una alta diversidad en CDR-H3. Tres
- 20 genotecas de fagos de novo (DNP00004 -169HC /LC mixto, DNP00005 -323HC /LC mixto y DNP00006 -551HC / LC mixto) que exhibían variantes de Fab en la proteína de recubrimiento de fago pIX se panearon contra células estables HEK293 G5 que expresan GPRC5D (células objetivo) para las rondas 1, 3, 5 y para las rondas 2 y 4 se

aplicó la ronda previa de fago Fab-pIX amplificado a células de fondo HEK293 (la selección negativa) (ver la Tabla 5). El fago Fab-pIX de novo de la ronda 1 unido a las células objetivo se recuperó para la amplificación durante la noche. El fago seleccionado de la ronda 1 se aplicó a las células de fondo para la ronda 2 en la cual el fago Fab-pIX no unido se recuperó para la amplificación durante la noche de fagos seleccionados negativamente. Se llevó a cabo otro conjunto de rondas de paneo positivas y negativas, las rondas 3 y 4. La ronda final se llevó a cabo con la última ronda de división de fagos amplificados seleccionados negativamente en dos muestras de paneo, una para las células objetivo y una para el paneo de células de fondo.

Tabla 5: Diagrama de flujo del paneo de fagos de células estándar-selección negativa

Ronda de paneo	Células usadas como antígeno
1	GPRC5D HEK293 humano
2	HEK293
3	GPRC5D HEK293 humano
4	HEK293
5 (dividir)	GPRC5D HEK293 humano
	HEK293

Paneo de fagos de células estándar (selección de fondo):

Las genotecas de exhibición de fagos Fab-pIX se añadieron a células HEK293 de acuerdo con entornos y tiempos de incubación similares a los del procedimiento de paneo de células estándar mencionado anteriormente (Tabla 6). Después de tres rondas, el ADN correspondiente al fago Fab-pIX unido a HEK293 se

usó para producir amplicones de PCR para NGS. Los resultados de estos NGS podrían usarse en un análisis sustractivo dinámico adicional dentro del software NGS2.0 para ayudar a distinguir candidatos Fab específicos objetivo posibles.

5 **Tabla 6: Diagrama de flujo del paneo de fagos de células estándar-selección de fondo**

Ronda de paneo	Células usadas como antígeno
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK293

Paneo de fagos celulares ACS (selección competitiva)

Se llevaron a cabo tres rondas de paneo por medio de la aplicación del fago Fab-pIX a una mezcla de células objetivo y células de fondo simultáneamente (Tabla 7). Para las rondas 1 y 2, las células objetivo con el fago Fab-pIX unido se clasificaron por medio de la señal GFP. Para capturar el fago Fab-pIX unido a partir de las células clasificadas se aplicó una lisis celular ácida seguida de una infección con E. coli. El fago Fab-pIX amplificado de la ronda 2 y la mezcla de células se clasificaron en dos poblaciones en la ronda final, se separaron para células objetivo GFP y se separaron para células de fondo distintas a GFP. El fago Fab-pIX unido para ambas poblaciones celulares se capturó por medio de lisis ácida e infección por E. coli

Tabla 7: Paneo de fagos celulares por FACS- selección competitiva

Ronda de paneo	Células usadas como antígeno
----------------	------------------------------

1	GPRC5D humano_GFP y HEK293
2	GPRC5D humano_GFP y HEK293
3	GPRC5D humano_GFP y HEK293

Secuenciación de Próxima Generación (NGS, por sus siglas en inglés) de paneo

5 de fagos

El crecimiento durante la noche bajo represión de glucosa se realizó para seis de las muestras de paneo de la última ronda. Estos cultivos se usaron para preparar el estuche ADN mini-prep, Qiagen QIAspin DNA. Las seis muestras de ADN se usaron como plantilla de PCR para generar amplicones que se midieron de HCDR1 a HCDR3.

10 Los seis amplicones se purificaron con gel y se agruparon manteniendo la versión 2.1, 3.0 separada del paneo de células estándar y se agruparon completamente para el paneo de células por FACS. Estos amplicones purificados con gel agrupados se proporcionaron a los servicios de Genewiz NGS para el procesamiento por medio de la tecnología MiSeq 1x300. Los archivos fueron suministrados por Genewiz y subidos a un

15 servidor local (nas2.0). Dentro de este servidor, la aplicación de software NGS2.0 se usó para cargar, leer y analizar los archivos de secuencias. Las secuencias 88 superiores de acuerdo con el número de copia (>50) y la relación entre las secuencias de células objetivo (+) y células de fondo (-) (relación >5:1) se seleccionaron para la conversión de IgG. Dado que la secuencia de cadena pesada variable es solo determinada por NGS,

20 fue necesario construir electrónicamente los constructos de cadena pesada completa en los marcos apropiados. Además, dado que se conocía solo la secuencia de cadena pesada, cada candidato se apareó con las cuatro cadenas ligeras parentales (A27, B3, L6, O12). La conversión final para los candidatos se realizó como IgG4PAA humano.

Análisis de detección ELISA y secuenciación estándar

A partir del mismo ADN prep usado para NGS, se realizó una digestión de enzimas de restricción y autoligado para extraer el gen pIX y permitir la expresión de Fab soluble. Se evaluó noventa y dos colonias, escogidas de cada una de las tres muestras de paneo para determinar la expresión de Fab por medio de ELISA y se secuenciaron para determinar la cadena pesada y la cadena ligera por el método de Sanger. Los candidatos finales con secuencia diversificada dentro de los LCDR se clonaron en plásmidos de expresión mamífera.

10 EJEMPLO 4: CARACTERIZACIÓN INICIAL DE ANTICUERPOS DE GPRC5D OBTENIDOS A TRAVÉS DE TECNOLOGÍA DE EXHIBICIÓN DE FAGOS

Unión de GPRC5D:

Se completó el paneo de fagos de células enteras con las células GPRC5D humanos como antígeno, como se describió anteriormente. De acuerdo con el análisis de NGS, se conocía solo la secuencia de cadena pesada para cada uno de los candidatos. En consecuencia, fue necesario aparear cada cadena pesada con las 4 cadenas ligeras parentales (A27, B3, L6, O12), de manera que se identificaron 348 mAbs de 87 secuencias de Hc con NGS. Estos mAbs se evaluaron inicialmente con respecto a la unión a GPRC5D de cyno por medio de FACS. La línea celular GPRC5D de cyno se seleccionó para la detección inicial a fin de maximizar la señal de unión potencial ya que la línea celular GPRC5D de cyno tenía un nivel de expresión más alto que la línea celular de GPRC5D humano. Brevemente, la detección por FACS se llevó a cabo por la normalización de la

concentración de proteínas hasta 1 ug/ml y se mezcló 100 ul de proteína con 200.000 células por pocillo. El mAb se dejó incubar con células durante 1 hora a 4 °C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y FBS al 0,2 %. Después, se añadió un mAb secundario antihumano con PE (Jackson cat. núm. 709-116-149) como el reactivo de detección. Las células y el anticuerpo secundario se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y FBS al 0,2 %. Las células se lavaron otra vez con PBS y FBS al 0,2 % y, después, se analizaron en FACSSarry.

Se observó que un número alto de los aciertos se unió a GPRC5D de cyno, incluidos 15 mAbs con un MFI mayor que 100.000, 23 mAbs con un MFI menor que 100.000, pero mayor que 10.000 y 63 mAbs con un MFI menor que 10.000, pero mayor que 1000. (Tabla 8).

Tabla 8: Datos de unión por FACS para mAbs derivados de NGS a GPRC5D de cyno.

Las secuencias de cadena pesada identificadas del análisis de NGS se aparearon con cada Lc parental, tal como se muestra. GC5M29 se usó como el control (cadena ligera de PH9L3). Los mAbs resaltados tienen un MFI >1000

Ident. de Hc	GPRC5D mAb [PH9L1 (A27)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L2 (B3)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L3 (L6)]	MFI	GPRC5D mAb MFI [PH9L4 (O12)]
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	GC5B25 31324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	GC5B68	2682	GC5B69 17416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	GC5B117 5037
GC5H15	GC5B158	14407	GC5B159	139766	GC5B160	84111	GC5B161 7856
GC5H13	GC5B202	89948	GC5B203	9173	GC5B204	15203	GC5MB205 52663
GC5H23	GC5B242	242	GC5B243	116641	GC5B244	249	GC5B245 469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	GC5B285 87116

5	GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
	GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
	GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	GC5B72	2013	GC5B73	3827
	GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	GC5B121	43924
	GC5H36	GC5B162	86773	GC5B163	21970	GC5B164	122043	GC5B165	1870
10	GC5H31	GC5B206	467	GC5B207	3636	GC5B208	481	GC5B209	1409
	GC5H29	GC5B246	202	GC5B247	3037	GC5B248	2835	GC5B249	1373
	GC5H34	GC5B286	239	GC5B287	163990	GC5B288	259	GC5B289	271
	GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	GC5B332	191978	GC5B333	1591
	GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	GC5B32	16553	GC5B33	270
15	GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
	GC5H25	GC5B122	153	GC5B123	237	GC5B124	6026	GC5B125	6197
	GC5H30	GC5B166	1510	GC5B167	6266	GC5B168	32482	GC5B169	327
	GC5H47	GC5B210	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
	GC5H42	GC5B250	3969	GC5B251	213233	GC5B252	63295	GC5B253	574
20	GC5H37	GC5B290	8839	GC5B291	201024	GC5B292	110940	GC5B293	305
	GC5H45	GC5B334	160	GC5B335	1434	GC5B336	3228	GC5B337	309
	GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	GC5B36	14936	GC5B37	297
	GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	GC5B81	74140
	GC5H43	GC5B126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	GC5B129	1283
	GC5H49	GC5B170	1014	GC5B171	51995	GC5B172	1434	GC5B173	332
	GC5H62	GC5B214	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	GC5B217	1589
	GC5H60	GC5B254	161	GC5B255	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
	GC5H94	GC5B294	190	GC5B295	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
	GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	GC5B340	1798	GC5B341	290
	GC5H85	GC5B38	10809	GC5B39	1112	GC5B40	110654	GC5B41	4379
	GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	GC5B84	1547	GC5B85	3563
	GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
	GC5H76	GC5B174	219	GC5B175	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
	GC5H68	GC5B218	21420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
	GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
	GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292
	GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
	GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	GC5B44	2694	GC5B45	1022
	GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	GC5B89	41027
	GC5H50	GC5B134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	GC5B137	2087

	GC5H28	GC5B178	750	GC5B179	6708	GC5B180	1005	GC5B181	535
	GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
	GC5H51	GC5B262	159	GC5B263	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
	GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	GC5B305	1571
	GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
5	GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	GC5B48	1320	GC5B49	392
	GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	GC5B92	1848	GC5B93	1780
	GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
	GC5H99	GC5B182	196	GC5B183	6421	GC5B184	309	GC5B185	280
	GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
	GC5H48	GC5B266	268	GC5B267	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
	GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
	GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	GC5B352	4300	GC5B353	1708
	GC5H56	GC5B50	229	GC5B51	36679	GC5B52	386	GC5B53	446
	GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
10	GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
	GC5H61	GC5B186	543	GC5B187	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
	GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
	GC5H5	GC5B17	243	GC5B18	301	GC5B19	1048	GC5B20	384
	GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
	GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
	GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487
	GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	GC5B104	3130	GC5B105	456
	GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
	GC5H73	GC5B190	236	GC5B191	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
	GC5H86	GC5B230	17885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
	GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
	GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
	GC5H95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
	GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
20	GC5H78	GC5B106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
	GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
	GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
	GC5H57	GC5B234	128355	GC5B235	195348	GC5B236	134008	GC5B237	11255
	GC5H41	GC5B274	313	GC5B275	7431	GC5B278	435	GC5B279	542
	GC5H58	GC5B318	2608	GC5B319	5791	GC5B320	49616	GC5B321	4823

GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	GC5B365	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	GC5B110	208487	GC5B111	692	GC5B112	140269	GC5B113	104136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	GC5B238	3698	GC5B239	4370	GC5B240	4676	GC5B241	825
5 GC5H88	GC5B278	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	GC5B334	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	GC5B368	6313	GC5B369	26116

Los 40 mAbs con la mayor afinidad de unión se seleccionaron para la caracterización adicional, que consistió en repetir el estudio de unión en células GPCR5D de cyno y también en evaluar la unión a células que expresan GPRC5D humano por medio de FACS (Tabla 9). Estos datos se analizaron para seleccionar 17 mAbs para purificación y generación de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 (resaltados). Los factores usados para seleccionar mAbs para purificación y generación de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 incluyen la especificidad de unión a GPRC5D humano, la reactividad cruzada a GPRC5D de cyno y la diversidad en la secuencia de Hc. Por ejemplo, GC5H36 se apareó con tres cadenas ligeras distintas y se analizó para determinar la unión (GC5B162, GC5B163, GC5B164). Solo se avanzó con GC5B164 ya que se observó que este mAb tenía el MFI más alto al GPRC5D humano en comparación con GC5B162 o GC5B163.

Tabla 9: Datos de unión por FACS para mAbs derivados de NGS a células HEK293F que expresan GPRC5D de cyno y humano. Las células HEK293F no transfectadas se

usaron para evaluar la especificidad de unión para GPRC5D. TF7M1636 se usó como el control del isotipo. Los mAbs resaltados se seleccionaron para un análisis mayor.

	Ident. de la proteína	Ident. del péptido HC	MFI de GPRC5D de cyno	MFI de GPRC5D humano	293F MFI
5	GC5B38	GC5H85	6.864	280	215
	GC5B110	GC5H75	142.277	2.543	235
	GC5B158	GC5H15	4.923	285	235
	GC5B162	GC5H36	75.139	2.981	230
	GC5B202	GC5H13	30.470	2.152	256
	GC5B218	GC5H68	10.451	277	263
	GC5B230	GC5H86	19.103	364	290
10	GC5B234	GC5H57	134.258	1.657	261
	GC5B51	GC5H56	22.661	667	480
	GC5B159	GC5H15	129.370	1.987	258
	GC5B163	GC5H36	7.605	840	310
	GC5B171	GC5H49	24.133	1.144	1.321
	GC5B235	GC5H57	158.011	2.643	254
	GC5B243	GC5H23	67.848	20.458	221
	GC5B251	GC5H42	74.510	11.418	235
15	GC5B281	GC5H34	109.418	5.317	570
	GC5B291	GC5H37	77.798	10.427	880
	GC5B32	GC5H26	3.597	14.656	358
	GC5B36	GC5H38	5.353	2.002	352
	GC5B40	GC5H85	67.279	4.510	310
	GC5B112	GC5H75	104.875	470	433
	GC5B160	GC5H15	40.881	635	276
	GC5B164	GC5H36	78.672	12.664	343
20	GC5B168	GC5H30	41.779	28.885	1.238
	GC5B204	GC5H13	5.090	390	212
	GC5B236	GC5H57	78.546	1.442	192
	GC5B252	GC5H42	22.010	1.498	204
	GC5B292	GC5H37	63.366	1.872	480
	GC5B320	GC5H58	63.345	22.891	231

5	GC5B332	GC5H35	106.515	13.348	253
	GC5B25	GC5H18	22.079	705	431
	GC5B69	GC5H17	1.593	851	284
	GC5B81	GC5H40	62.756	9.986	288
	GC5B89	GC5H39	31.613	1.068	251
10	GC5B113	GC5H75	66.475	550	323
	GC5B121	GC5H33	35.493	3.061	299
	GC5B205	GC5H13	63.610	25.199	260
	GC5B237	GC5H57	2.579	267	248
	GC5B285	GC5H14	81.405	19.870	225
10	GC5B369	GC5H84	16.241	559	252
	TF7M1636		956	2.621	1.538
	2° humano		209	316	228
	anti hGPCR5D		9.001	379	70
	anti-isotipo de ratón		60	82	65
10		sin tinción	44	50	33

El perfil de unión dependiente de la concentración de cada mAbs seleccionado con células HEK293 que expresan GPCR5D humano y células HEK293 no transfectadas se determinó por medio de FACS (Figura 1). Se observó que todos los mAbs se unen a GPCR5D humano en una forma dependiente de la dosis. Además, se observó que tres mAbs, GC5B36, GC5B168 y GC5B205 se unen a las células HEK293 no transfectadas (GPCR5D nulo) y se despriorizaron debido a esta interacción no específica con las células.

Los 14 mAbs restantes se seleccionaron para la generación de anticuerpos biespecíficos con un brazo anti-CD3 CD3B219 y un brazo nulo anti-RSV B23M46 (Tabla 10).

Tabla 10: La relación entre las Ident. de mAb y las Ident. biespecíficas de GPRC5D.

	Ident. de proteína de mAb de GPRC5D	x CD3 Ident. biespecífico	x B23Null Ident. biespecífico
5	GC5B320	GCDB44	GCDB30
	GC5B243	GCDB40	GCDB26
	GC5B285	GCDB43	GCDB29
	GC5B332	GCDB45	GCDB31
	GC5B164	GCDB35	GCDB21
10	GC5B251	GCDB41	GCDB27
	GC5B81	GCDB32	GCDB18
	GC5B235	GCDB38	GCDB24
	GC5B110	GCDB34	GCDB20
	GC5B202	GCDB36	GCDB22
	GC5B234	GCDB37	GCDB23
	GC5B252	GCDB42	GCDB28
	GC5B236	GCDB39	GCDB25
	GC5B89	GCDB33	GCDB19

Un anticuerpo biespecífico, GCDB38, se precipitó durante la recombinación y otro, GCDB36, contenía >10 % de agregado. Todos los demás anticuerpos biespecíficos aprobaron el criterio de liberación estándar y los anticuerpos biespecíficos de brazo nulo se analizaron para determinar la unión dependiente de la concentración a células HEK293 que expresan GPRC5D humano (Figura 2).

Se observó que todos los anticuerpos biespecíficos se unen en una forma dependiente de la dosis. GC5B320 se incluyó como un comparador de unión para entender las diferencias de unión entre mAbs bivalentes y anticuerpos biespecíficos monovalentes. GCDB44 se incluyó como un comparador de unión para entender las diferencias de unión entre anticuerpos biespecíficos anti-CD3 y mAbs de brazo nulo anti-RSV. La reducción esperada en la afinidad de unión aparente se observó al

comparar el mAb GC5B320 con los anticuerpos biespecíficos GCDB30 y GCDB44.

Además, se observó que el GCDB44 (Ab biespecífico anti-CD3) tenía una afinidad de unión ligeramente más alta con las células GPRC5D antihumanas en comparación con el GCDB30 (Ab biespecífico de brazo nulo anti-RSV), lo que demuestra el efecto

5 positivo en el brazo anti-CD3 de manera que se une a esta línea celular.

El panel de anticuerpos biespecíficos también se perfiló con respecto a la unión contra células MM1R y H929, que expresan GPRC5D endógenamente (Figura 3). El perfil de unión de los anticuerpos biespecíficos en células MM1R y H929 se comparó con las células GPCR5D HEK293 humanas sobreexpresadas y células HEK293 no transfectadas
10 mediante FACS. Se observó que los anticuerpos biespecíficos se unen a GPRC5D como se expresan endógenamente en células MM1R y H929 con un intervalo de afinidad. Se observó que la unión más alta fue a las células GPRC5D HEK humanas que, como línea celular estable sobreexpresada, tiene una densidad de receptores mucho más alta que las células MM1R o H929. No se avanzó con GCDB37, GCDB38, GCDB39 y GCDB41 debido
15 a la poca afinidad de unión observada para las células H929 y MM1R.

Citotoxicidad dependiente de células T *In vitro*

Después, se perfiló el panel de anticuerpos biespecíficos para determinar la potencia en un ensayo de citotoxicidad mediado por células T con células objetivo
20 H929 y MM1R (Figuras 4 A y B, Tabla 11). Brevemente, se hizo el conteo de las células objetivo (células H929, MM1.R, OPM2, LP-1 y Daudi o HEK parental y HEK+GPRC5D) y 10 millones de células se centrifugaron a 1350 rpm durante 3 minutos y los gránulos celulares se resuspendieron en 1 ml de solución de CFSE diluida (CellTrace, la tinción

de proliferación de CFSE se reconstituyó en 18 μ l de DMSO estéril y 1 μ l de la solución se diluyó en 10 ml de PBS estéril) y se incubaron a temperatura ambiente durante 8 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, se añadió 1 ml de FBS de HI a la suspensión celular para apagar el exceso de CFSE. Las células se lavaron dos veces en RPMI-1640 con 10 % de FBS. Después de su reconstitución en 10 ml de RPMI, se efectuó el recuento de las células y la viabilidad celular se registró en una hoja de cálculo. Las células se diluyeron a $2,2 \times 10^5$ /ml y se incubaron a 37 °C hasta su uso.

Las células T Pan de donadores normales se descongelaron en baño maría a 37 °C y, después, las células se centrifugaron a 1350 rpm a 4 °C durante 3 minutos.

Los sobrenadantes se descartaron y reconstituyeron en medio de cultivo a una concentración de $1,1 \times 10^6$ /ml. Se añadieron 2×10^5 células objetivo a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U, seguido de bloqueador de Fc (a la concentración final de 2 mg/ml). Todas las líneas celulares se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para bloquear la actividad del receptor de Fc. Se añadieron 1×10^5 células T a los pocillos (relación efectora:objetivo de 5:1). Después de mezclar las células T y las células objetivo, se añadieron 20 μ l de diluciones de Ab biespecíficos GPRC5D x CD3 a cada pocillo. Los anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 se diluyeron hasta 800 μ g/ml (10X) en PBS. La titulación se preparó en diluciones seriadas de 4 veces en PBS en una placa de 96 pocillos de fondo en U. La última columna se dejó como PBS solo (control de vehículo). Las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 48 horas.

Dos días más tarde (48 horas), las placas se centrifugaron y se almacenó 100 μ l de sobrenadantes a -80 °C para el ensayo de liberación de citocinas. Las células se lavaron

en 200 µl de PBS y se incubaron en 50 µl de colorante Live/Dead con emisión de fluorescencia en IR cercano (dilución 1:200) y anticuerpo anti-CD25 etiquetado con PE (dilución 1:50) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron una vez en 200 µl de regulador de FACS y por último se reconstituyeron en 150 µl de regulador de FACS. Las células se analizaron con el uso de FACSCanto II y FlowJo 7.6 para determinar la citotoxicidad en células objetivo (% de células objetivo) y la activación de células T CD25+ (% de células T vivas). La representación gráfica y el ajuste de los datos se realizaron en GraphPad Prism 6 que usa regresión no lineal con función de pendiente variable (cuatro parámetros) con el uso del método de los mínimos cuadrados.

Tabla 11: EC₅₀ promedio calculado a partir de la evaluación de citotoxicidad mediada por células T de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 con células objetivo H929 y MM1R.

GPRC5D x CD3 EC ₅₀ (nM)			
Ident. biespecífico	H929 (n= 5)	MM1R (n = 3)	Clasificación (promedio) H929:MM1R
GCDB32	0,39 ± 0,3	0,12 ± 0,1	2/1
GCDB33	4,29 ± 1,28	0,8 ± 0,18	7/6
GCDB34	2,13 ± 0,93	0,77 ± 0,24	5/5
GCDB35	1,39 ± 0,84	0,74 ± 0,32	4/4
GCDB36	5,2 ± 0,93	4,22 ± 0,55	8/9
GCDB40	1,2 ± 0,92	0,52 ± 0,38	3/3
GCDB41	NA	2,58 ± 0,15	10/8
GCDB43	0,36 ± 0,41	0,21 ± 0,29	1/2
GCDB44	10,29 ± 2,65	4,41 ± 0,29	9/10
GCDB45	2,25 ± 1	0,91 ± 0,93	6/7

Todos los anticuerpos biespecíficos son activos en la eliminación de células H929 mediada por células T, con un intervalo de potencias observado (Tabla 11). Se observó un orden de clasificación similar para ambas líneas celulares. Sin embargo, se observó una EC₅₀ más baja en células MM1R. Interesantemente, la afinidad de unión no fue necesariamente correlativa de la potencia en el ensayo de citotoxicidad mediado por células T. Por ejemplo, GCDB44 fue el anticuerpo biespecífico de unión con la máxima afinidad, pero el menos potente en el ensayo de citotoxicidad. El GCDB43, con una afinidad de unión similar, aunque ligeramente menor, fue el más potente en el ensayo de citotoxicidad.

Para evaluar la reactividad cruzada funcional con GPRC5D de cyno, el panel de anticuerpos biespecíficos se perfiló después con respecto a la citotoxicidad mediada por células T y la activación de células T con células GPRC5D HEK293 de cyno (Figuras 5A y B). Todos los anticuerpos biespecíficos fueron activos en este ensayo, si bien se observó un intervalo de potencia contra las células que expresan GPRC5D+ de cyno.

Eficacia *in vivo*

Después, se completó un estudio de referencia *in vivo* para entender la potencia *in vivo* de estos anticuerpos biespecíficos GPRC5D X CD3. Se seleccionó GCDB32 y GCDB35 (Figuras 5 A y B) para el ensayo en un modelo de tumor profiláctico de H929.

Las células H929 se implantaron en ratones NSG, una semana después de la inyección de PBMC humanos. El tratamiento de los anticuerpos biespecíficos se inició simultáneamente con la implantación de las células H929 y continuó cada 2 o 3 días (q2d o q3d) a dosis de 10 ug, 1 ug y 0,1 ug/animal durante un total de cinco tratamientos. Se

usó diez ratones en cada grupo y se incluyó PBS como el vehículo de control. El tratamiento se interrumpió en el día 11 y el estudio concluyó el día 25 (Figuras 6 A y B) o el día 26 (Figuras 12 A-D). Todos los anticuerpos GPRC5D x CD3 probados en este modelo profiláctico mostraron 100 % de inhibición del crecimiento tumoral en las dosis de 10 y 1 ug/ animal, excepto para GCDB35 que mostró una inhibición de alrededor 80 % del crecimiento tumoral en una dosis de 1 ug/animal. A una dosis diez veces menor (0,1 ug/animal), estos anticuerpos biespecíficos mostraron un grado variable de eficacia en el intervalo de 10 a 80 % de inhibición del crecimiento tumoral.

10 **Citotoxicidad dependiente de células T *In vitro* en presencia de bloqueador de Fc**

Para entender la especificidad del brazo de direccionamiento de GPRC5D se evaluó, después, el panel de anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 en un ensayo de citotoxicidad de redireccionamiento de células T en presencia del bloque de Fc. Este experimento fue crítico para entender la especificidad ya que las células objetivo para los anticuerpos biespecíficos son células B que expresan la capacidad de los receptores Fc γ para interactuar con la porción de Fc del anticuerpo biespecífico en el ensayo *in vitro*. Un desplazamiento en la potencia se observó en el ensayo de citotoxicidad mediado por células T para varios anticuerpos biespecíficos, y el desplazamiento mayor se observó para GCDB40 y GCDB34 (Figuras 7A-7B).

20 Después, se completó la medición directa de las interacciones de unión entre los cuatro anticuerpos biespecíficos más potentes (GCDB32, GCDB35, GCDB40 y GCDB43) y los receptores Fc γ (Figuras 8A-8D). Se llevó a cabo una ronda de análisis Alpha Screen para cada uno de los receptores Fc γ y anticuerpos biespecíficos

enumerados anteriormente. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. En FcγRI, los cuatro anticuerpos biespecíficos se comportaron como B21M hIgG4 PAA. Es decir, no son más competitivos que el isotipo de control coincidente. Además, se observaron diferencias similares entre el control hIgG1 WT y los cuatro anticuerpos biespecíficos en FcγRIIIa, en donde GCD43 fue el más parecido al isotipo de control IgG4PAA y los otros anticuerpos biespecíficos fueron los que presentaron una afinidad ligeramente mayor para FcγRIIIa. En FcγRIIa y FcγRIIb, los cuatro anticuerpos biespecíficos compiten en el orden siguiente: GCDB40 > GCDB32 > GCDB43 > GCDB35. GCDB40 es el más competitivo o el que se une con la máxima afinidad a FcγRIIa y FcγRIIb. De hecho, GCDB40 compete en FcγRIIa y FcγRIIb en la misma medida que hIgG1 WT, lo que corrobora el desplazamiento resultante en la potencia observada en el ensayo de citotoxicidad mediado por células T cuando se incluyó el bloque Fc. Debido a las interacciones inesperadas con FcγRIIa y FcγRIIb, no se avanzó con GCDB40.

15 **Ensayos de agrupamiento por competencia**

Los mAbs anti-GPRC5D se evaluaron para determinar la unión de competencia entre sí a las células de GPCR5D humano. Brevemente, las células se sembraron en placas a 50.000 células/pocillo en 50 uL de medio y se dejaron asentar durante 90 minutos a 37 °C. Después, los pocillos se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Los mAbs se marcaron con rutenio (II) tris-bipiridina, N-hidroxisuccinimida (marca con Ru) de acuerdo con procedimientos estándar. En una placa de 96 pocillos separada, se incubó 5 uM de mAb competidor con 50 nM de mAb marcado con Ru. La solución de bloqueo se eliminó de la placa celular y se añadió

25 uL de solución de mAb. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de lavar las placas tres veces con PBS, se añadió 150 uL de regulador de lectura MSD (sin surfactante) y se detectó la unión del anticuerpo marcado con R con un lector de placa de MSD.

- 5 Todos los mAbs pertenecen al mismo grupo de competencia, y solo el GC5B420 y el GC5B421 no compitieron completamente por GC5B81, GC5B285 y/o GC5B332 (bloqueado < 70 %) (Tabla 12). La hipótesis es que la unión simultánea de dos mAbs a GPRC5D puede ser estéricamente imposible debido al tamaño pequeño del dominio extracelular de GPRC5D en comparación con el tamaño de un mAb.

10

Tabla 12: Agrupamiento de epítomos de unión de competencia de mAbs anti-GPRC5D. Los mAbs anti-GPRC5D se evaluaron para determinar la unión de competencia entre sí a las células de GPCR5D humano (+/- = bloqueado < 70 %).

15

Ident. de mAb	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	+	+	+	+	+/-	+/-
GC5B164	+	+	+	+	+	+
GC5B285	+	+	+	+	+	+/-
GC5B332	+	+	+	+	+/-	+
GC5B420	+	+	+	+	+	+
GC5B421	+	+	+	+	+	+
GC5B243	+	+	+	+	+	+

20

EJEMPLO 4: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS GPRC5D CON TECNOLOGÍA DE HIBRIDOMAS

Se inmunizó a tres ratones Balb/c por ruta intradérmica-base de la cola con ADN plasmídico de pCMV6-neo (promotor de CMV) que expresa GPRC5D humano

de longitud completa en los días 0, 10 y 20. Se administró a los ratones inmunizaciones intraperitoneales e intravenosas finales en el día 59 con células de leucemia basofílica de rata (RBL, por sus siglas en inglés) que sobreexpresan GPRC5D humano de longitud completa. En el día 63 se recolectaron los nodos linfáticos y los bazos, se realizó el enriquecimiento de células B y las células se usaron para generar ~3500 hibridomas secretores de mAb.

EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN INICIAL DE ANTICUERPOS DE GPRC5D OBTENIDOS A TRAVÉS DE TECNOLOGÍA DE HIBRIDOMAS

Unión de GPRC5D

Las hibridomas se detectaron mediante FACS con respecto a la unión a células de RBL y GPRC5D humano que expresa células de RBL. Se calculó la relación del MFI ajustado con el fondo de cada mAb que se une a las células GPRC5D_RBL con respecto a las células RBL no transfectadas y cualquier muestra con una relación de unión mayor que 3 se consideró como potencialmente positiva. Noventa y nueve hibridomas tenían una relación mayor que 3 y se hicieron avanzar para la clonación de la región v. Se identificaron, sintetizaron, expresaron y purificaron treinta y una secuencias de mAbs. Dos de los 31 mAbs exhibieron unión a células RBL_GPRC5D por encima del fondo (Figuras 9A y 8B). Se seleccionó GCDB390 y GCDB396 para la expresión, purificación y generación de anticuerpos biespecíficos con CD3B219 del brazo anti-CD3 para generar los anticuerpos biespecíficos GCDB46 y GCDB47, respectivamente.

Citotoxicidad dependiente de células T

Se evaluaron GCDB46 y GCDB47 en el ensayo de citotoxicidad mediado por células T (Figuras 10A y 10B). Se observó que ambos anticuerpos biespecíficos eran potentes, con una EC₅₀ informada de 0,67 y 0,1 nM, respectivamente. Sobre la base de estos datos, se avanzó con ambos mAbs a la optimización primaria junto con los tres mAbs derivados de fagos.

EJEMPLO 6: EVALUACIÓN, SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE ACIERTOS

Se seleccionaron cinco anticuerpos biespecíficos GPRC5D para la optimización primaria (GCDB32, GCDB43, GCDB35, GCDB46, GCDB47) sobre la base de los datos de unión, función, reactividad cruzada y selectividad resumidos en la Tabla 13.

Tabla 13: Datos de la optimización primaria para anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3. Los anticuerpos biespecíficos se evaluaron en cuanto a la unión, función, reactividad cruzada y selectividad.

GPRC5D x CD3 Identificación	Selectividad	Muerte de células objetivo mediada por células T			
	Unión a GPRC5A, B, C	H929 EC50 ± SD (nM)	MM1R EC50 ± SD (nM)	H929 Sin Fc en comparación con bloque de Fc	GPRC5D de cyno EC50 (nM)
GCDB32	Sin unión	0,43 ± 0,29	0,12 ± 0,01	2,4	0,19
GCDB43	Sin unión	0,39 ± 0,07	0,54	2,8	0,95
GCDB40	Sin unión	1,2 ± 0,83	0,52 ± 0,31	5,1	10,61
GCDB35	Bajo	1,39 ± 0,75	0,74 ± 0,26	2,7	4,65
GCDB34	Sin unión	2,01 ± 0,74	0,77 ± 0,09	6,3	1,14
GCDB45	Sin unión	2,36 ± 0,84	0,91 ± 0,76	2,2	2,82
GCDB33	Sin unión	5,21 ± 1,21	0,8 ± 0,15	1,5	0,2
GCDB36	Bajo	5,57 ± 0,47	4,22 ± 0,29		3,35
GCDB46	Sin unión	0,67			

GCDB47	Sin unión	0,1			
GCDB48	Sin unión	0,17			No activa

La optimización primaria estaba dirigida a tratar los riesgos de la secuencia de modificación postraduccion potencial (PTM, por sus siglas en inglés) para GCDB32 (mAb parental de GC5B81), GCDB43 (mAb parental de GC5B285) y GCDB35 (mAb parental de GC5B164) como se describe en la Tabla 14.

Tabla 14: Cargas potenciales de secuencia de mitigación de PTM para aciertos derivados de fagos. Se muestran las secuencias de Hc CDR con las cargas de secuencias de PTM potenciales subrayadas.

(Las sec. con núm. de ident. para cada lista de secuencia se proporcionan en paréntesis)

ID de GPCR5D	Ident. de GPRC5D Hc	Hc CDR1	Hc CDR2	HcCDR3
GC5B81	GC5H40	SYAIS (1)	GIIPFGTANYAQKFQG (5)	ESRW <u>R</u> GYKLD (9)
GC5B285	GC5H14	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAD <u>S</u> VKG (28)	AAW <u>D</u> FGRRVRLDY (30)
GC5B164	GC5H36	SYW <u>I</u> G (27)	IIYPGD <u>S</u> DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)

Todas las variantes de PTM ensayadas para GC5B81 tenían una reducción sustancial en la afinidad de unión, lo que demuestra el estado crítico de este residuo (HC W102) al parátipo (Tabla 15).

Tabla 15: Secuencias CDR y datos de unión de la genoteca de GC5B81 PTM. El sitio de mutación está subrayado. La unión se clasificó como MFI >10.000 = ++;

MFI >1.000 = +; MFI <1.000

(Las sec. con núm. de ident. para cada lista de secuencia se proporcionan en paréntesis)

5

10

ID de GPRC5D	Ident. de cadena pesada	Mutación	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	GPRC5D humano (FACS)
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRYRGYKLDY (31)	-
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRVRGYKLDY (32)	-
GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRGYKLDY (33)	-
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRARGYKLDY (34)	-
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRFRGYKLDY (35)	-

15

Los estudios de unión identificaron una cantidad de mutaciones tanto para GC5B285 como para GC5B164 que retuvieron la unión a GPRC5D humano (Tablas 16 y 17).

20

Tabla 16: Secuencias CDR y datos de unión de la genoteca de GC5B164 PTM. El sitio de mutación está subrayado. La unión se clasificó como MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000.

(Las sec. con núm. de ident. para cada lista de secuencia se proporcionan en paréntesis)

ID de GPRC5D	Ident. de cadena pesada	Mutación	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	Unión a GPR5D
--------------	-------------------------	----------	---------	---------	---------	---------------

						humano (FACS)	
5	GC5B471	GC5H278	D55A, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B472	GC5H277	D55A, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B473	GC5H276	D55A, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B474	GC5H275	D55A, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B475	GC5H274	D55A, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
10	GC5B476	GC5H273	D55S, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B477	GC5H272	D55S, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B478	GC5H271	D55S, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B479	GC5H270	D55S, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B480	GC5H269	D55S, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
15	GC5B481	GC5H268	D55K, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B482	GC5H267	D55K, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B483	GC5H266	D55K, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B484	GC5H265	D55K, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B485	GC5H264	D55K, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
20	GC5B486	GC5H263	D55E, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B487	GC5H262	D55E, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B488	GC5H261	D55E, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B489	GC5H260	D55E, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
	GC5B490	GC5H259	D55E, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B491	GC5H258	D55Y, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

5	GC5B492	GC5H257	D55Y, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B493	GC5H256	D55Y, W33F	SYF <u>I</u> G (3)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B494	GC5H255	D55Y, W33G	SYG <u>I</u> G (38)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B495	GC5H254	D55Y, W33A	SYA <u>I</u> G (39)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
	GC5B496	GC5H253	W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPGDS <u>D</u> TRYSPSFQ G (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
10	GC5B497	GC5H252	W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPGDS <u>D</u> TRYSPSFQ G (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B498	GC5H251	W33F	SYF <u>I</u> G (3)	IIYPGDS <u>D</u> TRYSPSFQ G (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B499	GC5H250	W33G	SYG <u>I</u> G (38)	IIYPGDS <u>D</u> TRYSPSFQ G (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
	GC5B500	GC5H249	W33A	SYA <u>I</u> G (39)	IIYPGDS <u>D</u> TRYSPSFQ G (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
	GC5B501	GC5H248	D55A	SYWIG (27)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
15	GC5B502	GC5H247	D55S	SYWIG (27)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B503	GC5H246	D55K	SYWIG (27)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B504	GC5H245	D55E	SYWIG (27)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
	GC5B505	GC5H244	D55Y	SYWIG (27)	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

Tabla 17: Secuencias CDR y datos de unión de la genoteca de GC5B285 PTM. El sitio de mutación está subrayado. La unión se clasificó como MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000.

20 (Las sec. con núm. de ident. para cada lista de secuencia se proporcionan en paréntesis)

ID de GPRC5D	Ident. de cadena pesada	Mutación	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	GPRC5D humano (FACS)
--------------	-------------------------	----------	---------	---------	---------	----------------------

5	GC5B463	GC5H23 4	D62A,W10 1Y	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVK G (44)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	++
	GC5B432	GC5H22 8	D62S,W10 1V	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVK G (6)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	++
	GC5B465	GC5H22 7	D62S,W10 1F	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVK G (6)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	++
	GC5B433	GC5H22 3	D62K,W10 1V	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVK G (45)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	++
	GC5B434	GC5H22 2	D62K,W10 1F	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVK G (45)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	++
10	GC5B435	GC5H21 9	D62E,W10 1Y	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVK G (46)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	+
	GC5B436	GC5H21 7	D62E,W10 1F	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVK G (46)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	+
	GC5B461	GC5H21 6	D62E,W10 1G	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVK G (46)	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY (50)	-
	GC5B462	GC5H21 5	D62E,W10 1A	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVK G (46)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	++
	GC5B437	GC5H21 4	D62Y,W10 1Y	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	+
15	GC5B438	GC5H21 3	D62Y,W10 1V	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	+
	GC5B439	GC5H21 2	D62Y,W10 1F	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	+
	GC5B440	GC5H21 1	D62Y,W10 1G	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY (50)	-
	GC5B441	GC5H21 0	D62Y,W10 1A	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	+
	GC5B442	GC5H20 9	W101Y	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVK G (28)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	+
20	GC5B443	GC5H20 8	W101V	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVK G (28)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	+
	GC5B444	GC5H20 7	W101F	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVK G (28)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	+
	GC5B464	GC5H20 6	W101G	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVK G (28)	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY (50)	+
	GC5B445	GC5H20 5	W101A	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVK G (28)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	+
	GC5B446	GC5H20 4	D62A	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVK G (44)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+
	GC5B447	GC5H20 3	D62S	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVK G (6)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+

GC5B448	GC5H20 2	D62K	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVK G (45)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B449	GC5H20 1	D62E	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVK G (46)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B450	GC5H20 0	D62Y	NYWM S (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVK G (47)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+

5 Sobre la base de estos datos de unión se generó mAbs seleccionados como anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 y se evaluaron con respecto a la citotoxicidad mediada por células T de células H929 (Tabla 18).

Tabla 18: Actividad funcional de variantes de GPRC5D PTM seleccionadas para GCDB164 y GCDB285

Ident. de mAb de GPRC5D parental	Ident. de la proteína AA de GPRC5D	Ident. de GPRC5D x CD3	H929 EC ₅₀ (nM)	Seleccionado como primario
GC5B285	GC5B432	GCDB50	1,3	
	GC5B433	GCDB51	0,81	
	GC5B434	GCDB52	2,81	
	GC5B465	GCDB53	0,24	XX
	GC5B463	GCDB54	3,09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3,87	
	GC5B476	GCDB58	1,24	
	GC5B478	GCDB59	1,54	
	GC5B481	GCDB60	2,94	
	GC5B483	GCDB61	1,51	XX
	GC5B493	GCDB62	3,1	

Se observó un intervalo de potencia en el ensayo de citotoxicidad mediado por células T que no se pronosticó necesariamente por la afinidad de unión observada.

Por ejemplo, los GC5B465 y GC5B463 unidos con afinidad similar a GPRC5D humano difieren solo en la secuencia de 2 aminoácidos (Tabla 17) y se observó que tenían una diferencia de 12.5 veces en la potencia como los Abs biespecíficos GPRC5D x CD3 (Tabla 18). Sobre la base de los datos funcionales se seleccionó a GC5B465 y GC5B483 como secuencias optimizadas para GC5B285 (GCDB43 como CD3 biespecífico) y GC5B164 (GCDB35 como CD3 biespecífico).

Además, se completó la adaptación del marco humano para los mAbs de GPCR5D derivados de hibridomas murinos (GC5B390 y GC5B396 o GCDB46 y 47 como CD3 biespecíficos, respectivamente). Los estudios de unión identificaron una cantidad de marcos para GC5B396 y un marco para GC5B390 que retuvieron la unión a GPRC5D humano (Tabla 19).

Tabla 19: Datos de unión y funcionales para la adaptación del marco humano de genotecas de mAb de anti-GPRC5D derivados de hibridomas. La unión se clasificó como MFI >10.000 = +++; MFI >5.000 = ++; MFI > 1.000 = +; MFI <1.000.

Ident. de mAb GPRC5D parental	Ident. de AA de mAb GPRC5D	Ident. de cadena pesada	Ident. de cadena ligera	GPRC5D humano (FACS)	Ident. de GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GPRC5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	+		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	+++	GCDB69	0,58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	++		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	++		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	+		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	+++	GCDB68	2,51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	+		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	++		

5		GC5B533	GC5H241	GC5L56	+		
		GC5B532	GC5H240	GC5L56	+++	GCDB67	0,61
		GC5B531	GC5H242	GC5L56	++		
		GC5B530	GC5H243	GC5L56	+++	GCDB66	1,41
		GC5B529	GC5H241	GC5L55	++		
		GC5B528	GC5H240	GC5L55	+++	GCDB65	1,01
		GC5B527	GC5H242	GC5L55	-		
		GC5B526	GC5H243	GC5L55	++	GCDB64	1,5
10	GPCR5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	-		
		GC5B524	GC5H237	GC5L53	-		
		GC5B523	GC5H238	GC5L53	-		
		GC5B522	GC5H236	GC5L53	-		
		GC5B521	GC5H279	GC5L52	-		
		GC5B520	GC5H237	GC5L52	-		
		GC5B519	GC5H238	GC5L52	-		
		GC5B518	GC5H236	GC5L52	-		
		GC5B517	GC5H279	GC5L51	+		
		GC5B516	GC5H237	GC5L51	+		
		GC5B515	GC5H238	GC5L51	++	GCDB63	0,52
		GC5B514	GC5H236	GC5L51	+		
		GC5B513	GC5H279	GC5L50	-		
		GC5B512	GC5H237	GC5L50	+		
		GC5B511	GC5H238	GC5L50	+		
		GC5B510	GC5H236	GC5L50	+		
		GC5B509	GC5H279	GC5L49	-		
		GC5B508	GC5H237	GC5L49	+		
		GC5B507	GC5H238	GC5L49	+		
		GC5B506	GC5H236	GC5L49	+		
15							

20 Sobre la base de los datos de unión se generó varios mAbs anti-GPCR5D como anticuerpos biespecíficos de CD3 y se evaluaron con respecto a la citotoxicidad mediada por células T de células H929 (Tabla 18). El análisis funcional identificó a GCDB63, GCDB67 y GCDB69 como anticuerpos biespecíficos GPCR5D x CD3

potentes completamente humanizados. Sobre la base de estos datos, se seleccionó los mAbs anti-GPRC5D, GC5B515, GC5B532 y GC5B540 correspondientes como las secuencias completamente humanizadas para GC5B390 y GC5B391.

Después, la optimización primaria adicional de las secuencias completamente humanizadas se completó para solucionar riesgos de secuencias de modificación posteriores a la traducción potenciales para GC5B515, GC5B532 y GCDB540. Se generó una mutación G56S en la secuencia de cadena pesada para eliminar un riesgo potencial de desamidación para GC5B515 (Tabla 20).

Tabla 20: Actividad de unión y funcional de variantes de GPRC5D PTM seleccionadas para GGC5B532, GC5B540 y GCDB515.

Ident. de mAb GPRC5D parental	Ident. de AA de mAb GPRC5D	Mutación	GPRC5D humano (FACS)	Ident. de GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GC5B540	GC5B590	M64K	+++		
	GC5B592	G99A	+		
	GC5B594	M64K, G99A	+		
GC5 B532	GC5B591	M64K	+++		
	GC5B593	G99A	+		
	GC5B595	M64K, G99A	+		
GC5 B515	GC5B596	G56S	++	GCDB72	0,15

Las cadenas pesadas para GC5B532 y GC5B540 contenían una isomerización potencial y también un riesgo de oxidación. Se generó mutaciones M64K y G99A para aminorar este riesgo (Tabla 20). Todas las variantes ensayadas con la mutación G99A

exhibieron una reducción sustancial en la afinidad de unión, mientras que no hubo impacto en las variantes M64K y G56A. Sobre la base de los datos de unión solamente, se avanzó con GC5B596 para la evaluación potencial y se demostró la potencia como un CD3 biespecífico (GCDB72) en los ensayos de citotoxicidad mediada por células T.

5 Por lo tanto, se seleccionaron cuatro mAbs de GPRC5D biespecíficos para la caracterización adicional: GCDB32, GCDB53, GCDB61 y GCDB72. A continuación en las Tablas 21 y 22 se muestran las secuencias de CDR y de cadena pesada y ligera de los mAbs de GPRC5D usados para la generación de las moléculas biespecíficas.

10 **Tabla 21.** Secuencias de CDR de 4 candidatos de mAb de GPRC5D que mostraron unión contra GPRC5D humano y de cyno que resultaron funcionales cuando se generaron como CD3 biespecíficos.

15

20

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (sec. con núm. de ident. 1)	GIIPFGTAN YAQKFQG (sec. con núm. de ident. 5)	ESRWGRYK LD (sec. con núm. de ident. 9)	RASQSISSY LN (sec. con núm. de ident. 13)	AASSLQS (sec. con núm. de ident. 16)	QQSYSTPLT (sec. con núm. de ident. 19)
GC5B465	NYWMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 2)	GISYSGGSK YYASSVKG (sec. con núm. de ident. 6)	AAFDGRR AVRLD (sec. con núm. de ident. 10)	RASQSISSY LN (SEC. CON NUM. DE IDENT. 13)	AASSLQS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 16)	QQSYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 19)
GC5B483	SYFIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 3)	IIYPGKSDTR YSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 7)	VYSFGGRH KALFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 11)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
GC5B596	GYTMN (sec. con núm. de ident. 4)	LINPYNSDT NYAQKLQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 8)	VALRVALDY (sec. con núm. de ident. 12)	KASQNVAT HVG (sec. con núm. de ident. 15)	SASYRYS (sec. con núm. de ident. 18)	QQYNRYPT (sec. con núm. de ident. 21)

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3

Tabla 22: Secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de 4 candidatos de mAb de GPRC5D que mostraron unión contra GPRC5D humano y de cyno que resultaron funcionales cuando se generaron como CD3 biespecíficos.

Abm AA ID	Secuencia de aminoácidos VH	Sec. con núm. de ident.:	Secuencia de aminoácidos VL	Sec. con núm. de ident.
GC5B8 1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAIWVRQA PGQGLEWMGGIIPFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARESR WRGYKLDYWGGGTLVTVSS	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK	56
GC5B4 65	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYWMSWVRQ APGKGLEWVSGISYSGGSKY YASSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRSEDVAVYYCAKAA FDFGRRRAVRLDYWGQGLTV TVSS	53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGTK VEIK	56
GC5B4 83	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYFIGWVRQM PGKGLEWMGGIIPGKSDTRY SPSFQQQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVY SFGGRHKALFDYWGGGTLV TVSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTISLQPED FAVYYCQQRSNWPLTFGQG TKVEIK	57
GC5B5 96	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMNWVRQ APGQGLEWMGLINPYNSTDN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARV ALRVALDYWGQGLTVTVSS	55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCKASQNVATHVGWYQQKP GKAPKRLIYSASYRYSVPS RFSGSGSGTEFTLTISNLQPE DFATYYCQQYNRYPTFGQ GTKLEIK	58

EJEMPLO 7: PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS GPRC5D Y CD3 EN UN FORMATO BIESPECÍFICO EN IG G4 S228P, L234A, L235A

Los cuatro anticuerpos monoespecíficos GPRC5D (ver tabla 21) se expresaron como IgG4, que tiene sustituciones Fc S228P, L234A y L235A o S228P, L234A, L235A, F405L y R409K (brazo CD3) (numeración de acuerdo con el índice EU). Se generó, además, un anticuerpo anti-CD3 monoespecífico CD3B219 que comprende las regiones VH y VL que tienen la cadena pesada de la sec. con núm. de ident.: 25 y la cadena ligera de la sec. con núm. de ident.: 26 y la región constante de IgG4 con sustituciones S228P, L234A, L235A, F405L y R409K.

Los anticuerpos monoespecíficos se purificaron mediante el uso de métodos estándar con una columna de proteína A (columna HiTrap MabSelect SuRe).

Después de la elución, las reservas se dializaron en D-PBS, pH 7,2.

Los anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 se generaron al combinar un Abm monoespecífico para CD3 y un Abm monoespecífico para GPRC5D en un intercambio in vitro de brazos Fab (como se describe en la solicitud de patente núm. WO2011/131746). Brevemente, en aproximadamente 1-20 mg/ml en una relación molar de 1.08:1 de anticuerpo anti-GPRC5D/anti-CD3 en PBS, pH 7-7,4 y 75 mM de 2-mercaptoetanolamina (2-MEA) se mezcló junto y se incubó a 25-37 °C durante 2-6 horas, seguido por eliminación del 2-MEA a través de diálisis, diafiltración, filtración de flujo tangencial y/o filtración de célula por centrifugación mediante el uso de métodos estándar.

Las cadenas pesadas y ligeras para los Abs biespecíficos GPRC5D x CD3 se muestran más abajo en la Tabla 23.

Tabla 23. Secuencias de cadena pesada y ligera para Abs biespecíficos IgG4-PAA

Ab		Secuencia de aminoácidos
5	GCDB32	Cadena pesada 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:25)
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:26)
		QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
10	GCDB32	Cadena pesada 2 GC5B81 (sec. con núm. de ident.:52)
		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARESRWRGYKLDYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 2 GC5B81 (sec. con núm. de ident.:56)
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
15	GCDB53	Cadena pesada 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:25)
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:26)
		QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
20	GCDB53	Cadena pesada 2 GC5B465 (sec. con núm. de ident.:53)
		EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAP GKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKAADFGRRAVRLDYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 2 GC5B465 (sec. con núm. de ident.:56)
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
20	GCDB61	Cadena pesada 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:25)
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:26)
20	GCDB61	Cadena pesada 2
		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGK GLEWMGIYPGKSDTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGLTVTVSS

5		GC5B483 (sec. con núm. de ident.:54)	
		Cadena ligera 2 GC5B483 (sec. con núm. de ident.:57)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC QQRSNWPLTFGQGTKVEIK
	10	GCDB72 Cadena pesada 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 1 CD3B219 (sec. con núm. de ident.:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
		Cadena pesada 2 GC5B596 (sec. con núm. de ident.:55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAP GQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLTVTVSS
		Cadena ligera 2 GC5B596 (sec. con núm. de ident.:58)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVATHVGWYQQKPGK APKRLIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATY YCQQYNRYPTYFGQGTKLEIK

EJEMPLO 8: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GCDB32, GCDB53, GCDB61 Y GCDB72

Se evaluó GCDB32, GCDB53, GCDB61 y GCDB72 con respecto a la unión a GPRC5D murino (Tabla 24). Se observó los cuatro anticuerpos biespecíficos unidos a GPRC5D murino, con un intervalo de afinidades de unión.

Tabla 24: Unión de anticuerpos anti-GPCR5D x CD3 a GPRC5D murino.

Ident. de GPRC5D x CD3	Unión mediante FACS a GPRC5D murino (MFI)
GCDB32	1151
GCDB53	2658

GCDB61	3552
GCDB72	481

Además, se evaluó la reactividad cruzada con GPRC5D de cyno por medio del ensayo de citotoxicidad de redireccionamiento de células T de líneas celulares de GPRC5D humano y de cyno sobreexpresadas (Tabla 25). Un anticuerpo biespecífico GPRC5D x CD3 fue equipotente contra GPRC5D humano y de cyno (GCDB32), mientras que los otros biespecíficos ensayados fueron menos potentes en cuanto a la inducción de citotoxicidad de GPRC5D de cyno que de GPRC5D humano.

Tabla 25: Actividad funcional de anticuerpos GPRC5D x CD3 primarios contra células HEK que expresan GPRC5D humano y de cyno.

Ident. de GPRC5D x CD3	Células HEK de GPRC5D humano (EC ₅₀ en nM)	Células HEK de GPRC5D de cyno (EC ₅₀ en nM)
GCDB32	0,04	0,07
GCDB53	0,08	0,36
GCDB61	0,03	1,22
GCDB72	0,03	3,41

La caracterización adicional estaba dirigida a entender la unión in vitro (Figuras 11A-11E) y la potencia (Tabla 26).

Tabla 26: Citotoxicidad mediada por células T de varias líneas de células B que expresan GPRC5D humano por anticuerpos GPRC5D x CD3 primarios.

Ident. de GPRC5D x CD3	Células H929 EC ₅₀ en nM (Orden de clasificación)	MM1R EC ₅₀ en nM (Orden de clasificación)	OPM2 EC ₅₀ en nM (Orden de clasificación)	LP-1 EC ₅₀ en nM (Orden de clasificación)

GCDB32	0,45 (3)	0,04 (1)	0,98 (2)	1,02 (2)
GCDB53	0,69 (4)	0,28 (4)	2,83 (4)	1,58 (3)
GCDB61	0,39 (2)	0,06 (3)	1,46 (3)	1,67 (4)
GCDB72	0,22 (1)	0,04 (1)	0,77 (1)	0,7 (1)

Si bien se observó un intervalo de afinidades de unión, en donde GCDB61 fue el aglutinante más fuerte y GCDB72 y GCDB32 los aglutinantes más débiles, las potencias in vitro fueron muy similares para el panel de anticuerpos biespecíficos. Sin embargo, sobre la base del análisis del orden de clasificación, GCDB72 fue el más potente entre las diversas líneas de células B analizadas. Los experimentos de unión y potencia *ex vivo* con MNC derivados de pacientes produjeron resultados mucho más similares a los ensayos in vitro (Tabla 27 y Figuras 15A y 15B).

Tabla 27. Unión de anticuerpos biespecíficos GPCR5D x CD3, citotoxicidad mediada por células T y activación de células T de MNC derivados de pacientes MM.

Paciente	Ident. de AA de GPCR5D x CD3	EC ₅₀ de unión en nM	EC ₅₀ de citotoxicidad en nM	EC ₅₀ en nM de la activación de células T
MM303BM	GCDB32	16,1	0,36	0,18
	GCDB53	3,98	0,42	0,17
	GCDB61	5,53	0,89	0,22
	GCDB72	27,5	0,30	0,12
MM305BM	GCDB32	70,4	0,26	0,16
	GCDB53	10,2	0,26	0,19
	GCDB61	6,93	0,6	0,22
	GCDB72	65,9	0,28	0,12

GCDB61 exhibió la afinidad de unión más alta de MNC de pacientes mientras que GCDB72 y GCDB32 resultaron ser los aglutinantes más débiles. Otra vez, si bien se observaron diferencias en la afinidad de unión, todos los anticuerpos biespecíficos demostraron una eficacia menor a nanomoles en los ensayos de citotoxicidad

5 redireccionados a células T. Las moléculas fueron prácticamente indistinguibles sobre la base de la potencia *in vitro* y *ex vivo*; sin embargo, los datos *in vivo* proporcionaron diferenciación (Figuras 12A-12D).

Las células H929 se implantaron en ratones NSG, una semana después de la inyección de PBMC humanos. El tratamiento de los anticuerpos biespecíficos se inició
10 simultáneamente con la implantación de las células H929 y continuó cada 2 o 3 días (q2d o q3d) a dosis de 10 ug, 1 ug y 0,1 ug/animal durante un total de cinco tratamientos. Se usó diez ratones en cada grupo y se incluyó PBS como el vehículo de control. El tratamiento se interrumpió en el día 11 y el estudio concluyó el día 26 (Figuras 12 A-D). Todas las moléculas biespecíficas GPRC5D x CD3 ensayadas en este modelo
15 profiláctico mostraron 100 % de inhibición del crecimiento tumoral en las dosis de 10 y 1 ug/animal. La diferenciación se observó en la dosis más baja, 0,1 ug/animal, en donde GCDB72 demostró superioridad con respecto a los otros anticuerpos biespecíficos ensayados con un 80 % de inhibición del crecimiento tumoral observado.

20 **EJEMPLO 9: PERFIL DE UNIÓN DEL ANTICUERPO GPRC5D EN LA LÍNEA CELULAR GPRC5D⁺ MM1.R**

Las afinidades de unión de los anticuerpos GPRC5D en la línea celular MM de GPRC5D⁺ humano (MM1.R, adquirido de ATCC (Colección Estadounidense de

Cultivos Tipo)) se midieron por medio de FACS. La Figura 13 muestra que todos los anticuerpos primarios unidos a células MM.1R que expresan GPRC5D en una forma dependiente de la dosis con valores de EC_{50} en el intervalo de 0,10 nM a 135 nm, todos a excepción de GC5B602, son significativamente menores que los valores del anticuerpo comercial FAB6300 (R& D Systems cat núm. FAB6300A, clon núm. 571961) que produjo un valor de EC_{50} de 121,7 nM.

Las líneas celulares GPRC5D⁺ MM1.R se tiñeron durante 60 minutos con diversas concentraciones de anticuerpos primarios para medir los perfiles de unión a superficie (n=3). Se usó IgG4Fc humana marcada con ficoeritrina como un anticuerpo secundario para capturar la señal (Southern Biotech, clon HP6025, cat. núm. 9200-09). La unión se expresa como intensidad de fluorescencia media geométrica normalizada según se determina mediante FACS. La representación gráfica y el ajuste de los datos se realizaron en GraphPad Prism 6 que usa regresión no lineal con pendiente variable (cuatro parámetros) y el método de los mínimos cuadrados.

Además, se evaluó el perfil de unión de GPRC5D mAb GC5M481 en comparación con el anticuerpo comercial por medio de tres líneas celulares de mieloma múltiples de GPRC5D⁺ (JIM3, OPM-2 y MM.1R; líneas celulares adquiridas de ATCC) (Figura 14A). Además, se perfiló el GPRC5D mAb (GC5M481) para la reactividad cruzada de cyno con células Daudi que expresan GPRC5D de cyno, lo que demostró una unión fuerte en comparación con las células parentales (Figura 14A). También, cinco anticuerpos biespecíficos GPRC5D x CD3 (GCDB32, GCDB48, GCDB53, GCDB61 y GCDB72), cuando se evaluaron con respecto al potencial de unión por medio de líneas celulares de GPRC5D⁺ (JIM3, OPM-2 y MM1.R) (Figura 14B), mostraron una unión significativa como

se evidencia por el desplazamiento en el histograma (trazo negro sólido) en comparación con el isotipo de control (trazo en puntos, rellenos con color gris).

EJEMPLO 10: EFICACIA ANTITUMORAL DE GCDB72 CONTRA

5 XENOIMPLANTES SUBCUTÁNEOS DE MIELOMA MÚLTIPLE HUMANO MM.1S EN RATONES NSG CON PBMC HUMANIZADAS.

Este estudio *in vivo* se realizó para determinar la eficacia de GCDB72 contra xenoimplantes de mieloma múltiple (MM) humano MM.1S establecidos en ratones NSG con PBMC humanizadas. Se implantó por vía subcutánea (sc) en ratones NSG hembra
 10 de peso y edad similares células de MM humano MM.1S (1×10^7 células en 200 μ L de PBS por ratón) en el flanco trasero dorsal derecho el día 0 del estudio. En el día 7 después de la implantación celular, se inyectó 1×10^7 PBMC humano (en 200 μ L de PBS) por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Los tratamientos se iniciaron en el día 15 cuando el volumen tumoral medio era de aproximadamente 72 –
 15 78 mm³, se administró por vía intravenosa (iv) a cada ratón PBS o anticuerpo GCDB72 DuoBody en dosis de 0,1 μ g (0,005 mg/kg), 1 μ g (0,05 mg/kg), 10 μ g (0,5 mg/kg) y 50 μ g (2,5 mg/kg). Cada control DuoBody nulo, CD3 x nulo y nulo x GPRC5D se dosificó a 10 μ g por ratón. Los tratamientos se administraron aproximadamente cada tres días (q3d) para un total de siete dosis. Se observó una eficacia antitumoral robusta
 20 con las dos dosis altas (10 μ g y 50 μ g) de GCDB72, en donde los tumores sc de MM.1S exhibieron una regresión completa en el 100 % (10 de 10 por grupo) de los animales al final del estudio (Figura 16). Además, la dosis de 1 μ g por ratón inhibió significativamente el crecimiento tumoral en 65 % ($p \leq 0,0001$) en comparación con los

tumores tratados con PBS, mientras que la dosis de 0,1 µg tuvo un efecto bajo (TGI=19,3 %, p=0,0023). El efecto de CD3 x nulo no se consideró eficaz (TGI=28 %, p≤0,0001) y nulo x GPRC5D tuvo un efecto insignificante de 3,1 % TGI, p=0,9971. El TGI se determinó en el día 36 cuando había al menos 80 % de animales viables por grupo. La pérdida de peso corporal y/o la mortalidad significativa comenzaron a manifestarse después del día 36 debido a GVHD (Figura 17). El estudio concluyó el día 43 cuando había 60 % o un porcentaje menor de animales restantes en los grupos.

EJEMPLO 11: CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CÉLULAS DEPENDIENTE DE

ANTICUERPO (ADCC, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS) DE ANTICUERPOS GPRC5D

Se generó un panel de mAbs de GPRC5D antihumano como mAbs de IgG1. Además, se generó un panel nuevo de mAbs de GPRC5D antihumano como se describe en el Ejemplo 2. A continuación en las Tablas 28 y 29 se representan las secuencias de CDR y de región variable de cadena pesada y ligera de los nuevos mAbs de GPRC5D. Estos nuevos anticuerpos se usaron para la generación de moléculas CD3 biespecíficas como se describe en el Ejemplo 7 y, además, se incorporaron como mAbs de IgG1 para la evaluación de la actividad de ADCC.

Tabla 28. Secuencias de CDR de panel nuevo de anticuerpos GPRC5D

Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B382	DYGMH (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 61)	AIKYSGGST YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 67)	RAESGPGL DY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 72)	KSSQSVLYS SNNKNYLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 98)	WASTRES (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 78)	QQYYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 80)

	Identificación	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
5	GC5B379	NYWMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 2)	GISYSGGSK YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 28)	AAWDFGRR AVRLDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 30)	RASQSISSY LN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 13)	AASSLQS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 16)	QQSYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 19)
	GC5B373	SYWIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 27)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 29)	IGFYGRSFRI FDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 73)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
	GC5B376	SYWIG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 27)	IIYPGDS DTR YSPSFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 29)	VYSFGGRH KALFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 11)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
10	GC5B385	GYAMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 62)	AISGSGGST YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 68)	VDRSFGRS RYTLDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 74)	RASQSVSS YLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 14)	DASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 17)	QQRSNWPL T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 20)
	GC5B370 GC5B597	SYGIS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 63)	GIIPFGNIN Y A QKFQG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 69)	VSRRFKRFA YYFDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 75)	KSSQSVLYS SNNKNYLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 98)	WASTRES (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 78)	QQYYSTPLT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 80)
15	GC5B602	GYSFTGYT MN (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 64)	LINPYNGDT N (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 70)	VALRVALDY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 12)	KASQNVAT HVG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 15)	SASYRYS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 18)	QQYNRYPY T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 21)
	GC5B603	SYAMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 65)	AISGSGGST YYADSVKG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 68)	SNFLPVVFD Y (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 76)	RASQSVRK SLA (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 95)	TASNRAT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 79)	QQYFRAPIT (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 81)
20	GC5B601	GFSLT SYN VH (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 66)	VIWAGGSTN YNSALMS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 71)	DGIRLRFAY (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 77)	KASQNVAT HVG (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 15)	SASYRYS (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 18)	QQYNRYPY T (SEC. CON NÚM. DE IDENT. 21)

Tabla 29. Secuencias de región variable de cadena pesada y ligera del panel nuevo de anticuerpos GPRC5D

	Abm AA ID	Secuencia de aminoácidos VH	Sec. con núm. de ident.:	Secuencia de aminoácidos VL	Sec. con núm. de ident.
5	GC5B382	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVSAIKYSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKRAESGP GLDYWGQGTLVTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPLKLLIWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYY STPLTFGQGTKVEIK	92
10	GC5B379	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMSWVRQAP GKGLEWVSGISYSGGSKYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKAAWDFG RRAVRLDYWGQGTLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLASVGDVRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQSYSTPLTF GQGTKVEIK	56
15	GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIYPGDS TRYSP SFQQQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYICARIGFYGRS FRIFDYWGQGTLVTVSS	84	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFAVYYCQQRSNWPLTF GQGTKVEIK	57
15	GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIYPGDS TRYSP SFQQQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYICARVYSFGGR HKALFDYWGQGTLVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFAVYYCQQRSNWPLTF GQGTKVEIK	57
20	GC5B385	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKVD RSFG RSRYTLDYWGQGTLVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFAVYYCQQRSNWPLTF GQGTKVEIK	57

5	10	GC5B370 GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGGTFSSYGISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGNINYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARVSRRFKRFA YYFDYWGGGTLVTVSS	87	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQYY STPLTFGQGTKVEIK	92
		GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYSFTGYTMNWVRQAP GGLEWMGLINPYNGDTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYME LRSLRSDDTAVYYCARVALRV ALDYWGQGTLLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQNVATHVGWYQQ KPGKAPKRLIYSASYRSGV PSRFSGSGSGTEFTLTISNL QPEDFATYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK	58
		GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSNFLPV VFDYWGGGTLVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVRKSLAWYQQ KPGQAPRLLIYTASNATGI PARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQYFRAPITF GQGTKVEIKK	93
		GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETLTLC TVSGFSLTSYNVHWIRQPPGK ALEWLAVIWAGGSTNYNSALM SRLTISKDTSKSQVLTMTNMR AEDTATYYCARDGIRLRFAYW GQGTLLVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCASQNVATHVGWYQQ KPGQAPRLLIYSASYRSGI PARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK	94

- 15 Actividad de ADCC contra células H929 (Tablas 30 y 31). Brevemente, las células de mieloma múltiple se marcaron con calceína-AM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron a $0,2 \times 10^6$ /ml en RPMI + 10 % de HI FBS después de dos lavados con PBS. Los PBMC se descongelaron y resuspendieron después del lavado con PBS a 3×10^6 células por ml en medio de crecimiento RPMI. Se mezclaron 10000 o
- 20 50000 células objetivo con 100000 o 2500000 PBMC en presencia del anticuerpo y se incubaron durante 3 horas en la incubadora con CO₂ a 37 °C. Después de la incubación, la placa se centrifugó a 200 g durante 4 minutos y se transfirieron 100 ul de

sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y la intensidad de la fluorescencia se midió a 485/535 nM. Los valores de RFU se graficaron para calcular el porcentaje de lisis

Tabla 30: Citotoxicidad dependiente del anticuerpo de células H929 por mAbs anti-

5 GPRC5D con Fc de IgG1.

	Ident. de proteína IgG4 de GPRC5D	Ident. de proteína IgG1 de GPRC5D	Citotoxicidad de H929 EC ₅₀ (pM)	% de lisis
	GC5B243	GC5B382	1346,5	29,14
	GC5B285	GC5B379	87,4	17,3
10	GC5B332	GC5B373	244,2	32,94
	GC5B164	GC5B376	22,0	32,21
	GC5B320	GC5B385	944,0	29,73
	GC5B251	GC5B370	24,2	8
	GC5B515	GC5B602	27721,7	20
	GC5B420	GC5B603	3,4	16
	GC5B483	GC5B599	7,4	14
15	GC5B540	GC5B601	169,6	14
	GC5B465	GC5B598	2,0	12
	GC5B251	GC5B597	705,1	10

Tabla 31: Comparación de la citotoxicidad dependiente del anticuerpo y citotoxicidad mediada por células T de células H929.

20

		ADCC	Redireccionamiento de CD3
Ident. de proteína IgG1 de GPRC5D	Ident. de GPRC5D x CD3 DuoBody	Citotoxicidad de H929 EC ₅₀ (pM)	Citotoxicidad de H929 mediada por células T EC ₅₀ (nM)
GC5B382	GCDB40	1346,5	1,2 ± 0,83

5

GC5B379	GCDB43	87,4	0,39 ± 0,07
GC5B373	GCDB45	244,2	2,36 ± 0,84
GC5B376	GCDB35	22,0	1,39 ± 0,75
GC5B385	GCDB44	944,0	>10
GC5B370	GCDB41	24,2	>10
GC5B602	GCDB72	27721,7	0,15
GC5B603	GCDB48	3,4	0,17
GC5B599	GCDB61	7,4	1,51
GC5B601	GCDB69	169,6	0,58
GC5B598	GCDB53	2,0	0,24

10

15

20

Se observó un intervalo de potencia en el rango de 2 pM a 27,7 nM. La afinidad de unión no necesariamente pronosticó la eficacia en el ensayo de ADCC. Por ejemplo, GC5B382 y GC5B379 tenían una afinidad de unión similar a las células de GPRC5D humano, pero exhibieron una diferencia de 15x en la citotoxicidad contra células H929 en el ensayo de ADCC. De manera similar la inducción citotóxica como un biespecífico GPRC5D x CD3 no pronosticó la potencia en el ensayo de ADCC como se ejemplifica por GC5B370 y GC5B602. Cuando se formateó como un CD3 biespecífico, el GC5B602 (GCDB63) exhibió una potencia menor a nanomoles contra las células H929 mientras que GC5B370 como un CD3 biespecífico (GCDB41) fue esencialmente inactivo. Las mismas regiones v, cuando se formatearon como mAbs de IgG1 resultaron en la observación opuesta en el ensayo de ADCC, en donde se observó que GC5B370 era más potente (por ~1.100x veces) que GC5B602.

Breve descripción del listado de secuencias

Sec. con núm. de ident.:	Tipo	Especies	Descripción	Secuencia

5	1	PRT	humano	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431, Y GC5B429- HCDR1	SYAIS
	2	PRT	humano	GC5B379, GC5B598, GC5B465, GC5B285, GC5B463, GC5B432, GC5B433, GC5B434, GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462, GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464, GC5B445, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449 y GC5B450 - HCDR1	NYWMS
	3	PRT	humano	GC5B483, GC5B473, GC5B478, GC5B488, GC5B493, y GC5B498 - HCDR1	SYFIG
	4	PRT	humano	GC5B596- HCDR1	GYTMN
	5	PRT	humano	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431, y GC5B429- HCDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
	6	PRT	humano	GC5B598, GC5B465,	GISYSGGSKYYASSVKG

5				GC5B432 y GC5B447- HCDR2	
	7	PRT	humano	GC5B599, GC5B483, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485 Y GC5B503- HCDR2	IIYPGKSDTRYSPSFQG
	8	PRT	humano	GC5B596- HCDR2	LINPYNSDTNYAQKLQG
	9	PRT	humano	GCB581- HCDR3	ESRWGRGYKLD
10	10	PRT	humano	GC5B598, GCB5465- HCDR3	AAFDGRRVRLD
	11	PRT	humano	GC5B376, GC5B599, GC5B483, GC5B164, GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485, GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499, GC5B500, GC5B501, GC5B502,	VYSFGGRHKALFDY
15					
20					

5				GC5B503, GC5B504 Y GC5B505 – HCDR3	
	12	PRT	humano	GC5B602, GCB596- HCDR3	VALRVALDY
	13	PRT	humano	GC5B382, GC5B379, GC5B370, GC5B598, GC5B597, GC5B81, GC5B465- LCDR1	RASQSISSYLN
	14	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483- LCDR1	RASQSVSSYLA
10	15	PRT	humano	GC5B605, GC5B601, GC5B596- LCDR1	KASQNVATHVG
	16	PRT	humano	GC5B81, GC5B465, GC5B379, GC5B598- LCDR2	AASSLQS
15	17	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483- LCDR2	DASNRAT
	18	PRT	humano	GC5B602, GC5B601, GC5B596- LCDR2	SASYRYS
20	19	PRT	humano	GC5B379, GC5B598, GC5B81, GC5B465- LCDR3	QQSYSTPLT
	20	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599,	QQRSNWPLT

			GC5B483-LCDR3	
21	PRT	humano	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	humano	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILESAILGI VVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPQTQLLFL SV LGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCF SCLLAHASNLVKLVRGCVSFSWTTILCIAIGCSL LQ IIATEYVTIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVLL VYVFLMALTTFFVSKATFCGPCENWKQHGR LIFITV LFSIIIWVWVISMILLRGNPQFQRQPQWDDPVV CIALVTNAWVFLLYIVPELCILYRSCRQECPLQ GNAC PVTAYQHSFQVENQELSRARDSGAEEDVALT SYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGG V
23	PRT	cyno	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLESAILGI VVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPQTQLLFL SV LGLFGLAFAFIQLNQQTAPVRYFLFGVLFALCF SCLLAHASNLVKLVGRVFSFSWTTILCIAIGCSL LQVIAIEYVTIMTRGMMFVHMTPTYQLNVDFV LLVYVFLMALTTFFVSKATFCGPCENWKQHGR LIFITVLFSSIIIWVWVISMILLRGNPQFQRQPQW DPVVCIALVTNA WVFLLYIVPELCILYRSCRQECPSQGHACPV TAYQRSFQVENQELSRARDSGAEEDVALTSF GTPIQPQTVDPTQECFIPRAKLSPQQDAGV
24	PRT	ratón	GPRC5D	MYEDCVKSTEDYYLFCNEGPAIVLESILAVIG IVVTILLLLAFLFLMRKVQDCSQWNVLPQTQLFL LAV LGLFGLTFAFIIQLNHQTAPVRYFLFGVLFALCF SCLLAHASNLVKLVGRVFSFCWTTILFIAIGVSL LQ TIIAIEYVTIMTRGLMFEHMTPTYQLNVDFVCLLI YVFLMALTTFFVSKATFCGPCENWKQHGR LIFATV LVSIIIWVWVISMILLRGNPQLQRQPHWDDAVICI GLVTNAWVFLLYIPELSILYRSCRQECPTQGN VC QVPVYQRSFRMDTQEPTRARDSGAEEDVAL TAYGTPIQLQSADPSREYLIPSATLSPQQDAGL
25	PRT	humano	CD3B219-CADENA PESADA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

5	26	PRT	humano	CD3B219-LIGHT CHAIN	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVL
	27	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504 Y GC5B505 - HCDR1	SYWIG
	28	PRT	humano	GC5B379, GC5B285, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464 Y GC5B445- HCDR2	GISYSGGSKYYADSVKG
10	29	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499 Y GC5B500- HCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG
	30	PRT	humano	GC5B379, GC5B285, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449 Y GC5B450- HCDR3	AAWDFGRRVRLDY
15	31	PRT	humano	GC5B427- HCDR3	ESRYRGYKLDY
	32	PRT	humano	GC5B428- HCDR3	ESRVRGYKLDY
	33	PRT	humano	GC5B430- HCDR3	ESRGRGYKLDY
	34	PRT	humano	GC5B431- HCDR3	ESRARGYKLDY
	35	PRT	humano	GC5B429H CDR3-VH	ESRFRGYKLDY
20					

5	36	PRT	humano	GC5B471, GC5B476, GC5B486, GC5B481, GC5B491 y GC5B496, - HCDR1	SY <u>Y</u> IG
	37	PRT	humano	GC5B497, GC5B472, GC5B477, GC5B482, GC5B487, Y GC5B492- HCDR1	SY <u>V</u> IG
	38	PRT	humano	GC5B474, GC5B479, GC5B484, GC5B489, GC5B494, Y GC5B499- HCDR1	SY <u>G</u> IG
10	39	PRT	humano	GC5B475, GC5B480, GC5B485, GC5B490, GC5B495, Y GC5B500- HCDR1	SYA <u>I</u> G
	40	PRT	humano	GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, Y GC5B501- HCDR2	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG
15	41	PRT	humano	GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480 Y GC5B502 - HCDR2	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG
	42	PRT	humano	GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, Y GC5B504- HCDR2	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG
	43	PRT	humano	GC5B491, GC5B492, GC5B493,	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG
20					

5				GC5B494, GC5B495, Y GC5B505- HCDR2	
	44	PRT	humano	GC5B463 Y GC5B446- HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG
	45	PRT	humano	GC5B433, GC5B434 Y GC5B448- HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG
10	46	PRT	humano	GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462 Y GC5B449- HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG
	47	PRT	humano	GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, Y GC5B450- HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG
	48	PRT	humano	GC5B463, GC5B435, GC5B437 y GC5B442- HCDR3	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY
15	49	PRT	humano	GC5B432, GC5B433, GC5B438 y GC5B443- HCDR3	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY
	50	PRT	humano	GC5B461, GC5B440 Y GC5B464- HCDR3	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY
	51	PRT	humano	GC5B462, GC5B441 Y GC5B445- HCDR3	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY
20	52	PRT	humano	GC5B81-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIIP IFGTANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARE SRWRGYKLDYWGQGTLLTVSS
	53	PRT	humano	GC5B598, GC5B465- VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNY WMSWVRQAPGKGLEWVSGISY SGGSKYYASS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AKAAFDGRRAVRLDYWGQGT LLTVSS

5	54	PRT	humano	GC5B599, GC5B483- VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFI GWVRQMPGKGLEWMGIYPGKSDTRYSPSFQG QVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARVY SFGGRHKALFDYWGGQGLTVTVSS
	55	PRT	humano	GC5B596- VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTG YTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQ KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARVALRVALDYWGQGLTVTVSS
	56	PRT	humano	GC5B379, GC5B598, GC5B81 y GC5465-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIK
	57	PRT	humano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483- VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLT FGQGTKVEIK
	58	PRT	humano	GC5B596, GC5B602- VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHV GWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSQVPSRFSG SGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK
10	59	PRT	humano	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG K
	60	PRT	humano	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
15	61	PRT	humano	GC5B382- HCDR1	DYGMH
	62	PRT	humano	GC5B385- HCDR1	GYAMS
20					

5	63	PRT	humano	GC5B370, GC5B597- HCDR1	SYGIS
	64	PRT	humano	GC5B602- HCDR1	GYSFTGYTMN
	65	PRT	humano	GC5B603- HCDR1	SYAMS
	66	PRT	humano	GC5B601- HCDR1	GFSLTSYNVH
	67	PRT	humano	GC5B382- HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
10	68	PRT	humano	GC5B603, GC5B385- HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
	69	PRT	humano	GC5B370, GC5B597- HCDR2	GIIPIFGNINYAQKFQG
	70	PRT	humano	GC5B602- HCDR2	LINPYNGDTN
	71	PRT	humano	GC5B601- HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
	72	PRT	humano	GC5B382- HCDR3	RAESGPGLDY
15	73	PRT	humano	GC5B373- HCDR3	IGFYGRSFRIDY
	74	PRT	humano	GC5B385- HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY
	75	PRT	humano	GC5B370, GC5B597- HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
	76	PRT	humano	GC5B603- HCDR3	SNFLPVVFDY
	77	PRT	humano	GC5B601- HCDR3	DGIRLRFAY
20	78	PRT	humano	GC5B382, GC5B370, GC5B597- LCDR2	WASTRES
	79	PRT	humano	GC5B603- LCDR2	TASNRAT
	80	PRT	humano	GC5B382, GC5B370, GC5B597- LCDR3	QQYYSTPLT

5	81	PRT	humano	GC5B603-LCDR3	QQYFRAPIT
	82	PRT	humano	GC5B382-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY GMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKRAESGPGLDYWGQGT LVTVSS
	83	PRT	humano	GC5B379-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKAAWDFGRRAVRLDYWGQGT LVTVSS
	84	PRT	humano	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RIGFYGRSFRIFDYWGQGT LVTVSS
	85	PRT	humano	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYW IGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARV YSFGGRHKALFDYWGQGT LVTVSS
10	86	PRT	humano	GC5B385-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VDRSFGRSRYTLDYWGQGT LVTVSS
	87	PRT	humano	GC5B370, GC5B597-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGNINYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARV SRRFKRFAYYFDYWGQGT LVTVSS
	88	PRT	humano	GC5B602-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTG YTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGD TNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARVALRVALDYWGQGT LVTVSS
15	89	PRT	humano	GC5B603-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKSNFLPVVFDYWGQGT LVTVSS
	90	ADN	humano	GC5B596-cadena ligera	atgcgggtgctggcccagctgctgggactgctgctgtgcttcct ggcgccagatgcgacatccagatgacccagagccccagcagcc tgagcgccagcgtggcgaccgggtgacctcacctgcaaggcc agccagaacgtggccacccacgtgggtggtaccagcagaagc cgggaaggccccaagcggctgatctacagcgccagctaccg gtacagcggtgcccagcgggtcagcggcagcggcagcggc accgagttcacctgacctcagcaacctgcagcccaggacttc gccacctactgcccagcagtaaacgggtacccctacacctg gccagggcaccaagctggagatcaagcgtagcgtgggtgacc atctgtctcatcttcccgccatctgatgagcagtgaaatctggaact gcctctgtgtgtgcctgctgaataactctatcccagagaggccaaa
20					

				gtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc ctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaac acaaagtctacgctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgc ccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtga	
5	91	PRT	humano	GC5B601- VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTSYN VHWIRQPPGKALEWLAVIWAGGSTNYNSALMS RLTISKDTSKSQVVL TMTNMRAEDTATYYCAR DGIRLRFAYWGQGLTVTVSS
	92	PRT	humano	GC5B382, GC5B597, GC5B370 - VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS SVLYSS NNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ YYSTPLTFGQGTKVEIK
	93	PRT	humano	GC5B603- VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSL AWYQQKPGQAPRLLIYTASN RATGIPARFSGS SGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYFRAPITF GQGTKVEIKK
10	94	PRT	humano	GC5B601- VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATH VGWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYS GIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK
	95	PRT	humano	GC5B603- LCDR1	RASQSVRKSLA
15	96	ADN	humano	GC5B596- cadena pesada	atggcctgggtctggaccctgctgttctgatggccgctgccagagc atccaggcccaggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaa gaagcccgccgagcgtgaaggtgagctgaaggccagcggt acagcttcaccggctacacatgaactgggtgcggcaggccccc gccagggcctggagtggatgggcctgatcaacccctacaacagcg acaccaactacgccagaagctgcagggccgggtgacctgacc accgacaccagcaccagcaccgcctacatggagctgcggagcct gcggagcgcagacaccgccgtgtactactgcgccgggtggccct gcgggtggccctggactactggggccagggcaccctggtgaccgt gagcagcgcctccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccc tgctccaggagcacctccgagagcacagccgcccctgggctgctg gtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctgtggaactcag gcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcc tcaggacttactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcag cttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcccag caacaccaaggtggacaagagagttgagtc aaataggtcccc atgccaccatgccagcacctgaggccgcccgggggaccatcagt cttctgttcccccaaaaccaaggacactctcatgatctccggac ccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagacc cgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatg ccaagacaaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaccgt gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggca aggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgctcctccat cgagaaaaccatctccaagccaagggcagccccgagagcca caggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaac caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctacccagcgacat
20					

				cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac aagaccacgcctccgtgctggactccgacggctccttctccttac agcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgt cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacaca gaagagcctctccctgtctctgggtaaata
--	--	--	--	---

10

15

20