

ANTICUERPO ANTI-GPRC5D Y MOLÉCULA QUE COMPRENDE EL ANTICUERPO

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-GPRC5D novedoso y a una molécula que comprende el anticuerpo.

Antecedentes de la Invención

La familia C del receptor acoplado a la proteína G grupo 5 miembro D (GPRC5D) es uno de los receptores acoplados a la proteína G encontrados por la búsqueda de homología de la base de datos EST usando las secuencias de aminoácidos de una serie de GPCRs humanos (Literatura No de Patentes 1). Los receptores del grupo 5 familia C de GPCR (receptores GPRC5) tienen 4 subtipos (GPRC5A, GPRC5B, GPRC5C, y GPRC5D) y se conocen también como receptores acoplados a la proteína G huérfanos inducibles por ácido retinoico (RAIG) debido a que su expresión se induce por la estimulación del ácido retinoico (Literatura No de Patentes 2). Sin embargo, no han sido reveladas todavía las funciones biológicas o ligando biológico de GPRC5D, el subtipo de proteína G para acoplarse con ello, etc.

En cuanto a la asociación del gen GPRC5D con cánceres, se sabe que GPRC5D se expresa altamente en el mieloma múltiple. Específicamente, se sabe que por ejemplo: la sobreexpresión de GPRC5D se correlaciona con un pobre pronóstico de los pacientes con mieloma múltiple (Literatura No de Patentes 3); y la proporción de células que expresan GPRC5D se disminuye por la medicación de pacientes con mieloma múltiple (Literatura No de Patentes 4). Tal asociación de la sobreexpresión de GPRC5D con cánceres sugiere la posibilidad de que el GPRC5D sirva como un excelente objetivo terapéutico para los cánceres. Adicionalmente, existe un informe sobre un anticuerpo anti-GPRC5D y un anticuerpo biespecífico que comprende el anticuerpo y un anticuerpo anti-CD3 y muestra actividad de enlace contra células 3T3 que expresan GPRC5D (Literatura de Patentes 1) de manera exógena. Sin embargo, los productos farmacéuticos de uso médico que atacan el GPRC5D no han sido desarrollados todavía.

Lista de Citas

Literatura de Patentes

Literatura de Patentes 1 Publicación internacional No. WO2016/090329

Literatura No de Patentes

Literatura No de Patentes 1 H Brauner-Osborne, et al., Biochim Biophys Acta., publicado en abril de 2001, Vol. 1518 (No. 3), p. 237-248

Literatura No de Patentes 2 S Inoue, et al., Journal of Investigative Dermatology, publicado en marzo 2004, Vol. 122 (No. 3), p. 565-573

Literatura No de Patentes 3 J Atamaniuk, et al., European Journal of Clinical Investigation, publicado en mayo de 2012, Vol. 42 (No. 9), p. 953-960

Literatura No de Patentes 4 Y Cohen, et al., Hematology, publicado en noviembre de 2013, Vol. 18 (No. 6), p. 348-351

Breve Descripción de la Invención

Problema Técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-GPRC5D que tenga un efecto anticáncer, un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, y una molécula que comprenda el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula, etc.

Un objetivo alternativo de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula, un vector que tiene un inserto del polinucleótido, una célula transfectada con el polinucleótido o vector, y un método para producir el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula, que comprende la etapa de cultivar la célula. Un objetivo alternativo adicional de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento de un cáncer usando el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula.

Solución al Problema

Los inventores actuales han llevado a cabo estudios cuidadosos para lograr los objetivos y han completado la presente invención al desarrollar un anticuerpo novedoso anti-GPRC5D y encontrado que el anticuerpo tiene un efecto anti-cáncer.

La presente invención proporciona:

(1) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera descrita en cualquiera de lo siguiente (I) a (III):

(II)

una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 49, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 57,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 59,

(I)

una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 45,

5 la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 47,

y

10 una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 54,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55, y

15 la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 56,

y

(III)

una región variable de cadena pesada que comprende

20 la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 60,

30 la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 61, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62 y enlaza a GPRC5D humano;

(2) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la
35 región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en (II);

(3) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena

pesada y la región variable de cadena ligera descritas en (I);

(4) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en (III);

5 (5) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno es un anticuerpo quimérico o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo;

(6) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno es un anticuerpo humanizado o un
10 fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo;

(7) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno es un anticuerpo humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo;

(8) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1), (3),
15 y (6), en donde el anticuerpo comprende

una región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por

los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 64,

los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66,

20 los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68,

los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70,

y

los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72,

y

25 una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por

los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74,

los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76,

los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78,

30 y

los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80;

(9) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1), (3), (6), y (8), en donde el anticuerpo comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de

35 una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por

los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74,

y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por

los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 64,

- y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80,
- 5 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y
- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80,
- 10 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72;
- (10) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1), (4), y (6), en donde el anticuerpo comprende
- una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por
- 15 los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, o
- los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, y
- una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por
- 20 los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88, los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90, y
- 25 los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92;
- (11) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1), (4), (6), y (10), en donde el anticuerpo comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de
- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por
- 30 los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88,
- 35 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90,

- y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90,
- 5 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, y
- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92,
- 10 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82;
- (12) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en donde el anticuerpo comprende Fc;
- (13) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo enlaza a GPRC5D humano y comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena
- 15 ligera descrita en cualquiera de los siguientes ① a ④:
- ①
- una región variable de cadena pesada que comprende
- la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 111,
- 20 la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 112, y
- la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 113,
- y
- 25 una región variable de cadena ligera que comprende
- la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 114,
- la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 115, y
- 30 la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 116,
- ②
- una región variable de cadena pesada que comprende
- la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:
- 35 117,
- la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 118, y
- la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

119,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

5 120,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

121, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

122,

10 ③

una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

123,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

15 124, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

125,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

20 la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

126,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

127, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

25 128, y

④

una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

129,

30 la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

130, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

131,

y

35 una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

132,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

133, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 134;

(14) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (13), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en ①;

(15) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (13), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en ②;

(16) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (13), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en ③;

(17) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (13), en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera son la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas en ④;

(18) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (13) a (17), en donde el anticuerpo comprende

una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97,

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 105, y la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109,

y

una región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99,

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103,

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 107, y

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135;

(19) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (13) a (18), en donde el anticuerpo comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99,

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103,

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por

SEQ ID NO: 105, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 107, y

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135;

(20) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende cualquier combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145,

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 147,

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 148, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 149, y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 150, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 151;

(21) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones severas a una hebra complementaria de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (8) a (12) y (18) a (20), y enlaza a GPRC5D humano;

(22) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno comprende una secuencia de aminoácidos 90% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (8) a (12) y (18) a (20), y enlaza a GPRC5D humano;

(23) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno comprende una secuencia de aminoácidos derivada por la sustitución, delección, o adición de 1 a varios aminoácido(s) a partir de una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (8) a (12) y 18 a 20, y enlaza a GPRC5D humano;

(24) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno enlaza a un sitio sobre GPRC5D humano enlazado por un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (20);

(25) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno compete con un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (20) para enlace a GPRC5D humano.

(26) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno de acuerdo con cualquiera de (1) a (25), en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno enlaza a GPRC5D de mono cynomolgus;

(27) El anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (26), en donde el fragmento de enlace de antígeno es Fab, F(ab)', Fv, scFv, o sdAb;

(28) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera descritas de acuerdo con (2),(8) o (9), y que comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217.

(29) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y que comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada

por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

- 5 iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

10 o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217.

15 (30) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera descritas de acuerdo con (2),(8) o (9), y que comprende Fc mutado.

20 (31) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y que comprende Fc mutado.

25 (32) Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31);

(33) Un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con (32);

30 (34) Una célula que comprende cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con (32) o un vector de acuerdo con (33), o producir un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31);

(35) Un inmunocito artificial que comprende un polinucleótido de acuerdo con (32) o un vector de acuerdo con (33), o que expresa un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) sobre la superficie celular;

35 (36) Un método para producir un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo el cual enlaza a GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus, que comprende las etapas de: cultivar una célula de acuerdo con (34); y recuperar un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo el cual enlaza a GPRC5D humano a partir de los cultivos;

(37) Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo el cual enlaza a GPRC5D

humano, el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno que se obtiene por un método de acuerdo con (37);

(38) Una composición farmacéutica para tratamiento y/o prevención que comprende un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) y (37), un polinucleótido de acuerdo con (32), un vector de acuerdo con (33), o un inmunocito artificial de acuerdo con (35) como un ingrediente activo;

(39) La composición farmacéutica de acuerdo con (38), en donde la composición farmacéutica es para el tratamiento y/o prevención de un cáncer;

(40) La composición farmacéutica de acuerdo con (39), en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer ovárico, cáncer pulmonar, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cérvico-uterino, cáncer sanguíneo, linfoma, o melanoma maligno que expresan una proteína GPRC5D;

(41) La composición farmacéutica de acuerdo con (40), en donde el cáncer es mieloma múltiple que expresa una proteína GPRC5D;

(42) Una molécula que tiene actividad de enlace a antígeno, que comprende un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) y (37);

(43) La molécula de acuerdo con (42), en donde la molécula es multiespecífica;

(44) La molécula de acuerdo con (42) o (43), en donde la molécula comprende un anticuerpo que se enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) y (37), y

un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende

la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 183,

la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 238, y

la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 185, y

una región variable de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 186,

la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 239, y

la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 188,

y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus;

(45) La molécula de acuerdo con (44), en donde, en la CDR2 de cadena pesada, el primer Xaa se selecciona del grupo que consiste en (A, E, G, H, I, L, T, V, R, y S), y el segundo Xaa es S; o el primer Xaa es N, y el segundo Xaa se selecciona del grupo que consiste en (E, R, F, Y, L, V, I, K, y T), y en la CDR2 de cadena ligera, Xaa se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D)

y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus;

(46) La molécula de acuerdo con (44) o (45), en donde, en la CDR2 de cadena pesada, el primer Xaa se selecciona del grupo que consiste en (R y S), y el segundo Xaa es S, y en la CDR2 de cadena ligera, Xaa

se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D), y enlaza a la CD3 humana y CD3 de mono cynomolgus;

(47) La molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (45), en donde el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 240 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 241, 242, y 243;

y en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 240, el primer Xaa se selecciona del grupo que consiste en (A, E, G, H, I, L, T, V, R, y S), y el segundo Xaa es S; o el primer Xaa es N, y el segundo Xaa se selecciona del grupo que consiste en (E, R, F, Y, L, V, I, K, y T),

y en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 241, 242, y 243, Xaa se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D);

(48) La molécula de acuerdo con (47), en donde el primer Xaa se selecciona del grupo que consiste en (R y S), y el segundo Xaa es S en SEQ ID NO: 240, y Xaa se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D) en cualquiera de las SEQ ID NOs: 241, 242, y 243;

(49) La molécula de acuerdo con (42) o (44), en donde la molécula comprende un anticuerpo que se enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) y (37), y

un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende

una región variable de cadena pesada que comprende

la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 183,

la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 184, y

la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 185, y

una región variable de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 186,

la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 187, y

la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 188,

y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus;

(50) La molécula de acuerdo con (49), en donde el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 155 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 156, 181, y 183;

(51) La molécula de acuerdo con cualquiera de (44) a (50), en donde el fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus es Fab, F(ab)', Fv, scFv, o sdAb;

(52) La molécula de acuerdo con cualquiera de (44) a (51), en donde el anticuerpo que enlaza a la CD3

humana y la CD3 de mono cynomolgus es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano que comprende una región constante de inmunoglobulina humana, Fc o Fc mutado;

(53) La molécula de acuerdo con cualquiera de (44) a (52), en donde el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 180, 181, y 182;

(54) La molécula de acuerdo con cualquiera de (40) a (44), en donde el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo se enlaza con el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (31) y (37) por medio de un enlazador o sin un enlazador;

(55) La molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (44) en donde la molécula comprende un anticuerpo que se enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (2), (8) o (9), y

un anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 132 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209,

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 130 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213,

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 244 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 244,

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 245 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 241 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 245,

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 246 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada

• una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 254 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 254, o

• una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 255 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 255;

(56) La molécula de acuerdo con (55) en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado;

(57) La molécula de acuerdo con (55) en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado;

(58) La molécula de acuerdo con (55) el cual comprende

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 219 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 221 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 225 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 227 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 229 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de

aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 231 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por
 5 SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
 y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de
 10 aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 233 y Fc mutado; o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por
 15 SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
 y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de
 aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 235 y Fc mutado;

(59) La molécula de acuerdo con (55) la cual comprende

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por
 25 SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
 y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de
 aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 225 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por
 30 SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
 y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de
 35 aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 227 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 229 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 231 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 233 y Fc mutado; o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 235 y Fc mutado;

(60) La molécula de acuerdo con (55) en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que

comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

- 5 i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,
- 10 ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,
- 15 iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
- 20 o
- iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
- 25 y
- el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende
- v) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 133 al 238 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209, o
- 30
- vi) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 143 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213;
- 35

(62) La molécula de acuerdo con (55) la cual comprende

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 119 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 238 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209

o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213;

(63) La molécula de acuerdo con (55) en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y Fc mutado, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado;

(64) La molécula de acuerdo con (55) la cual comprende

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 271 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 223 y Fc mutado, y el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de

antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 219 y Fc mutado o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 271 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 223 y Fc mutado, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 221 y Fc mutado;

(65) La molécula de acuerdo con (53), en donde el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo se enlaza con el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con (19) por medio de un enlazador o sin un enlazador;

(66) La molécula de acuerdo con (54) o (65), en donde la molécula tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 171 to 179 y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y al GPRC5D humano;

(67) Una molécula la cual comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones severas a una hebra complementaria de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo contenido en una molécula de acuerdo con cualquiera de (50), (53), (58), (59), (62), (64), (65) y (66), y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y al GPRC5D humano;

(68) Una molécula la cual comprende una secuencia de aminoácidos 90% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (50), (53), (58), (59), (62), (64), (65) y (66), y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y al GPRC5D humano;

(69) Una molécula la cual comprende una secuencia de aminoácidos derivada por la sustitución, delección, o adición de 1 a varios aminoácido(s) a partir de una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo contenido en una molécula de acuerdo con cualquiera de (50), (53), (58), (59), (62), (64), (65) y (66), y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y al GPRC5D humano;

(70) La molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (69), en donde la molécula enlaza al GPRC5D de mono cynomolgus;

(71) La molécula de acuerdo con cualquiera de (43) a (70), en donde la molécula es biespecífica;

(72) La molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (71), en donde la molécula es un polipéptido;

(73) Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de

aminoácidos de una molécula de acuerdo con (72);

(74) Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con (73);

(75) Una célula que produce un polinucleótido de acuerdo con (73) o un vector de acuerdo con (74), o una molécula de acuerdo con (71);

5 (76) Un método para producir una molécula enlace a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y al GPRC5D humano, que comprende las etapas de: cultivar una célula de acuerdo con (75); y recuperar una molécula enlace para CD3 humana y CD3 de mono cynomolgus y/o para GPRC5D humano a partir de los cultivos;

10 (77) Una molécula enlace a CD3 humana y CD3 de mono cynomolgus y a GPRC5D humano, la molécula que se obtiene mediante un método de acuerdo con (76);

(78) La molécula de acuerdo con (77), en donde la molécula enlaza a GPRC5D de mono cynomolgus;

(79) Una composición farmacéutica para tratamiento y/o prevención que comprende una molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (72), (77), y (78), un polinucleótido de acuerdo con (73), o un vector de acuerdo con (74) como un ingrediente activo;

15 (80) La composición farmacéutica de acuerdo con (79), en donde la composición farmacéutica es para el tratamiento y/o prevención de un cáncer;

20 (81) La composición farmacéutica de acuerdo con (80), en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer ovárico, cáncer pulmonar, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cérvico-uterino, cáncer sanguíneo, linfoma, o melanoma maligno que expresan una proteína GPRC5D;

(82) La composición farmacéutica de acuerdo con (79) o (80), en donde el cáncer es mieloma múltiple que expresa una proteína GPRC5D;

25 (83) Un método para el tratamiento de y/o prevención de un cáncer, que comprende administrar una molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (72), (77), y (78) o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (79) a (82);

(84) La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (79) a (82), en donde la composición farmacéutica induce citotoxicidad a células que expresan GPRC5D por la redirección de células T a las células;

30 (85) El método de acuerdo con (83), en donde el método induce citotoxicidad a células que expresan GPRC5D por la redirección de células T a las células;

(86) Un método para inducir citotoxicidad a células que expresan GPRC5D por la redirección de células T a las células, que comprende la etapa de administrar una molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (72), (77), y (78) o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (79) a (82); y

35 (87) Un método para redirigir células T a células que expresan GPRC5D, que comprende la etapa de administrar una molécula de acuerdo con cualquiera de (42) a (72), (77), y (78) o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de (79) a (82).

Efectos Ventajosos de la Invención

De acuerdo con la presente invención, se obtienen un anticuerpo novedoso anti-GPRC5D o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo el cual enlaza a GPRC5D humano, y una molécula novedosa que comprende el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo y que tiene actividad de enlace a antígeno. La molécula puede comprender un anticuerpo anti-CD3.

El uso del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, y la molécula proporcionados por la presente invención permite el tratamiento o prevención de diversos cánceres, preferiblemente, mieloma múltiple, que expresan una proteína GPRC5D.

Breve Descripción de los Dibujos

FIG. 1. La FIG. 1 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de anticuerpos anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4) contra GPRC5D humano mediante citometría de flujo. El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 2. La FIG. 2 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos con terminal amino de GPRC5D humano (SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias).

FIG. 3. La FIG. 3 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos con terminal amino de GPRC5D humano (SEQ ID NO: 2 del Listado de Secuencias).

FIGS. 4A-4B. Las FIGS. 4A-4B son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de los anticuerpos anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4) contra GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo. El enlace disulfuro intramolecular de un péptido estuvo presente (FIG. 4A) o ausente (FIG. 4B).

FIG. 5. La FIG. 5 es un diagrama que muestra que los anticuerpos anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4) tienen actividad ADCC.

FIG. 6. La FIG. 6 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador para la amplificación PCR del ADNc que codifica la región variable del gen de cadena pesada de 2A4 (SEQ ID NO: 3 del Listado de Secuencias).

FIG. 7. La FIG. 7 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador para la amplificación PCR del ADNc que codifica la región variable del gen de la cadena ligera de 2A4 (SEQ ID NO: 10 del Listado de Secuencias).

FIG. 8. La FIG. 8 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2A4 (SEQ ID NO: 4 del Listado de Secuencias).

FIG. 9. La FIG. 9 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2A4 (SEQ ID NO: 5 del Listado de Secuencias).

FIG. 10. La FIG. 10 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2B1 (SEQ ID NO: 6 del Listado de Secuencias).

FIG. 11. La FIG. 11 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2B1 (SEQ ID NO: 7 del Listado de Secuencias).

FIG. 12. La FIG. 12 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 7B4 (SEQ ID NO: 8 del Listado de Secuencias).

FIG. 13. La FIG. 13 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7B4 (SEQ ID NO: 9 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 14. La FIG. 14 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2A4 (SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias).

FIG. 15. La FIG. 15 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2A4 (SEQ ID NO: 12 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 16. La FIG. 16 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2B1 (SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias).

FIG. 17. La FIG. 17 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2B1 (SEQ ID NO: 14 del Listado de Secuencias).

FIG. 18. La FIG. 18 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 7B4 (SEQ ID NO: 15 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 19. La FIG. 19 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7B4 (SEQ ID NO: 16 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 20. La FIG. 20 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal secretora de cadena κ humana y una región constante de cadena κ humana (SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias).

FIG. 21. La FIG. 21 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador F para un vector de expresión de cadena ligera (SEQ ID NO: 18 del Listado de Secuencias).

FIG. 22. La FIG. 22 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador R para el vector de expresión de cadena ligera (SEQ ID NO: 19 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 23. La FIG. 23 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal de cadena pesada humana y una región constante de IgG1 humana (SEQ ID NO: 20 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 24. La FIG. 24 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 21 del Listado de Secuencias).

FIG. 25. La FIG. 25 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 22 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 26. La FIG. 26 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 23 del Listado de Secuencias).

FIG. 27. La FIG. 27 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto

cebador R para la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 24 del Listado de Secuencias).

FIG. 28. La FIG. 28 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 25 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 29. La FIG. 29 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 141), región constante (posiciones de aminoácidos 142 a 471)) (SEQ ID NO: 26 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 30. La FIG. 30 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 27 del Listado de Secuencias).

FIG. 31. La FIG. 31 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador R para la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (SEQ ID NO: 28 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 32. La FIG. 32 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias).

FIG. 33. La FIG. 33 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 30 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 34. La FIG. 34 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 31 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 35. La FIG. 35 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador R para la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias).

FIG. 36. La FIG. 36 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 33 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 37. La FIG. 37 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 34 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 38. La FIG. 38 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias).

FIG. 39. La FIG. 39 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador R para la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (SEQ ID NO: 36 del Listado de Secuencias).

FIG. 40. La FIG. 40 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 37 del Listado de Secuencias).

FIG. 41. La FIG. 41 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 126), región constante (posiciones de aminoácidos 127 a 233)) (SEQ ID NO: 38 del Listado de Secuencias).

FIG. 42. La FIG. 42 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 39 del Listado de Secuencias).

FIG. 43. La FIG. 43 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador R para la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 40 del Listado de Secuencias).

FIG. 44. La FIG. 44 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 41 del Listado de Secuencias).

FIG. 45. La FIG. 45 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 42 del Listado de Secuencias).

FIG. 46. La FIG. 46 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador F para la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 43 del Listado de Secuencias).

FIG. 47. La FIG. 47 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un conjunto cebador R para la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (SEQ ID NO: 44 del Listado de Secuencias).

FIG. 48. La FIG. 48 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de los anticuerpos quiméricos humanos (c2A4, c2B1, y c7B4) contra GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 49. La FIG. 49 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de los anticuerpos quiméricos humanos (c2A4, c2B1, y c7B4) contra GPRC5D de mono cynomolgus usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 50. La FIG. 50 es un diagrama que muestra que los anticuerpos quiméricos humanos (c2A4, c2B1, y c7B4) tienen actividad ADCC contra GPRC5D humano.

FIG. 51. La FIG. 51 es un diagrama que muestra la actividad inhibidora de crecimiento tumoral *in vivo* de 2A4 quimérico humano (c2A4) contra ratones BALB/c-nu/nu trasplantados con KHM-1B de la línea celular de mieloma múltiple humano que expresa GPRC5D.

FIG. 52. La FIG. 52 es un diagrama que muestra la actividad inhibidora de crecimiento tumoral *in*

vivo de 2B1 quimérico humano (c2B1) contra ratones BALB/c-nu/nu trasplantados con KHM-1B de la línea celular de mieloma múltiple humano que expresa GPRC5D.

FIG. 53. La FIG. 53 es un diagrama que muestra la actividad inhibidora de crecimiento tumoral *in vivo* de 7B4 quimérico humano (c7B4) contra ratones BALB/c-nu/nu trasplantados con KHM-1B de la línea celular de mieloma múltiple humano que expresa GPRC5D.

FIG. 54. La FIG. 54 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 45 del Listado de Secuencias).

FIG. 55. La FIG. 55 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 46 del Listado de Secuencias).

FIG. 56. La FIG. 56 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 47 del Listado de Secuencias).

FIG. 57. La FIG. 57 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 48 del Listado de Secuencias).

FIG. 58. La FIG. 58 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 49 del Listado de Secuencias).

FIG. 59. La FIG. 59 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 50 del Listado de Secuencias).

FIG. 60. La FIG. 60 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 51 del Listado de Secuencias).

FIG. 61. La FIG. 61 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 52 del Listado de Secuencias).

FIG. 62. La FIG. 62 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 53 del Listado de Secuencias).

FIG. 63. La FIG. 63 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 54 del Listado de Secuencias).

FIG. 64. La FIG. 64 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 55 del Listado de Secuencias).

FIG. 65. La FIG. 65 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 56 del Listado de Secuencias).

FIG. 66. La FIG. 66 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 57 del Listado de Secuencias).

FIG. 67. La FIG. 67 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 58 del Listado de Secuencias).

FIG. 68. La FIG. 68 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 59 del Listado de Secuencias).

FIG. 69. La FIG. 69 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 60 del Listado de Secuencias).

FIG. 70. La FIG. 70 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de

cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 61 del Listado de Secuencias).

FIG. 71. La FIG. 71 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (SEQ ID NO: 62 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 72. La FIG. 72 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L1) (SEQ ID NO: 63 del Listado de Secuencias).

FIG. 73. La FIG. 73 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 64 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 74. La FIG. 74 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L2) (SEQ ID NO: 65 del Listado de Secuencias).

FIG. 75. La FIG. 75 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L2) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 66 del Listado de Secuencias).

FIG. 76. La FIG. 76 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L3) (SEQ ID NO: 67 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 77. La FIG. 77 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L3) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 68 del Listado de Secuencias).

FIG. 78. La FIG. 78 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L4) (SEQ ID NO: 69 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 79. La FIG. 79 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 70 del Listado de Secuencias).

FIG. 80. La FIG. 80 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L5) (SEQ ID NO: 71 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 81. La FIG. 81 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L5) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 127), región constante (posiciones de aminoácidos 128 a 234)) (SEQ ID NO: 72 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 82. La FIG. 82 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H1) (SEQ ID NO: 73 del Listado de Secuencias).

FIG. 83. La FIG. 83 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472))

(SEQ ID NO: 74 del Listado de Secuencias).

FIG. 84. La FIG. 84 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H2) (SEQ ID NO: 75 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 85. La FIG. 85 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H2) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 76 del Listado de Secuencias).

FIG. 86. La FIG. 86 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H3) (SEQ ID NO: 77 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 87. La FIG. 87 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H3) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 78 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 88. La FIG. 88 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H4) (SEQ ID NO: 79 del Listado de Secuencias).

FIG. 89. La FIG. 89 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H4) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 80 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 90. La FIG. 90 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L1) (SEQ ID NO: 81 del Listado de Secuencias).

FIG. 91. La FIG. 91 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 126), región constante (posiciones de aminoácidos 127 a 233)) (SEQ ID NO: 82 del Listado de Secuencias).

FIG. 92. La FIG. 92 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L2) (SEQ ID NO: 83 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 93. La FIG. 93 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L2) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 126), región constante (posiciones de aminoácidos 127 a 233)) (SEQ ID NO: 84 del Listado de Secuencias).

FIG. 94. La FIG. 94 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H1) (SEQ ID NO: 85 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 95. La FIG. 95 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H1) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 86 del Listado de Secuencias).

FIG. 96. La FIG. 96 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena

pesada humanizada 7B4 (h7B4_H2) (SEQ ID NO: 87 del Listado de Secuencias).

FIG. 97. La FIG. 97 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H2) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 88 del Listado de Secuencias).

FIG. 98. La FIG. 98 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H3) (SEQ ID NO: 89 del Listado de Secuencias).

FIG. 99. La FIG. 99 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H3) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 90 del Listado de Secuencias).

FIG. 100. La FIG. 100 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H5) (SEQ ID NO: 91 del Listado de Secuencias).

FIG. 101. La FIG. 101 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H5) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 92 del Listado de Secuencias).

FIG. 102. La FIG. 102 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de anticuerpos humanizados anti-GPRC5D h2B1 contra GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 103. La FIG. 103 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de anticuerpos humanizados anti-GPRC5D h7B4 contra GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 104. La FIG. 104 es un diagrama que muestra que 2B1 humanizado y 7B4 humanizado tienen actividad ADCC.

FIG. 105. La FIG. 105 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos del péptido terminal amino de GPRC5D de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 93).

FIG. 106. La FIG. 106 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador A usado en el análisis de secuencias de scFv (SEQ ID NO: 94).

FIG. 107. La FIG. 107 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador B usado en el análisis de secuencia de scFv (SEQ ID NO: 95).

FIG. 108. La FIG. 108 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 96 del Listado de Secuencias).

FIG. 109. La FIG. 109 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 97 del Listado de Secuencias).

FIG. 110. La FIG. 110 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región

variable de cadena ligera de un anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 98 del Listado de Secuencias).

FIG. 111. La FIG. 111 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 99 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 112. La FIG. 112 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 100 del Listado de Secuencias).

FIG. 113. La FIG. 113 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 101 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 114. La FIG. 114 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 102 del Listado de Secuencias).

FIG. 115. La FIG. 115 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 103 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 116. La FIG. 116 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 104 del Listado de Secuencias).

FIG. 117. La FIG. 117 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 105 del Listado de Secuencias).

FIG. 118. La FIG. 118 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 106 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 119. La FIG. 119 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 107 del Listado de Secuencias).

FIG. 120. La FIG. 120 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 108 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 121. La FIG. 121 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 109 del Listado de Secuencias).

FIG. 122. La FIG. 122 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 110 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 123. La FIG. 123 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 135 del Listado de Secuencias).

FIG. 124. La FIG. 124 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 111 del Listado de Secuencias).

FIG. 125. La FIG. 125 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 112 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 126. La FIG. 126 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 113 del Listado de Secuencias).

FIG. 127. La FIG. 127 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 114 del Listado de Secuencias).

FIG. 128. La FIG. 128 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 115 del Listado de Secuencias).

FIG. 129. La FIG. 129 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 116 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 130. La FIG. 130 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 117 del Listado de Secuencias).

FIG. 131. La FIG. 131 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 118 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 132. La FIG. 132 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 119 del Listado de Secuencias).

FIG. 133. La FIG. 133 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 120 del Listado de Secuencias).

FIG. 134. La FIG. 134 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 121 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 135. La FIG. 135 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 122 del Listado de Secuencias).

FIG. 136. La FIG. 136 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 123 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 137. La FIG. 137 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 124 del Listado de Secuencias).

FIG. 138. La FIG. 138 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 125 del Listado de Secuencias).

FIG. 139. La FIG. 139 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 126 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 140. La FIG. 140 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 127 del Listado de Secuencias).

FIG. 141. La FIG. 141 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 128 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 142. La FIG. 142 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 129 del Listado de Secuencias).

FIG. 143. La FIG. 143 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 130 del Listado de Secuencias).

FIG. 144. La FIG. 144 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 131 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 145. La FIG. 145 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 132 del Listado de Secuencias).

FIG. 146. La FIG. 146 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 133 del Listado de Secuencias).

FIG. 147. La FIG. 147 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 134 del Listado de Secuencias).

FIG. 148. La FIG. 148 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 136 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 149. La FIG. 149 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG del anticuerpo humano C2037 (SEQ ID NO: 137 del Listado de Secuencias).

FIG. 150. La FIG. 150 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 138 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 151. La FIG. 151 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG del anticuerpo humano C3048 (SEQ ID NO: 139 del Listado de Secuencias).

FIG. 152. La FIG. 152 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 140 del Listado de Secuencias).

FIG. 153. La FIG. 153 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG del anticuerpo humano C3015 (SEQ ID NO: 141 del Listado de Secuencias).

15 FIG. 154. La FIG. 154 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 142 del Listado de Secuencias).

FIG. 155. La FIG. 155 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG del anticuerpo humano C3022 (SEQ ID NO: 143 del Listado de Secuencias).

20 FIG. 156. La FIG. 156 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la forma IgG del anticuerpo humano C2037 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 134), región constante (posiciones de aminoácidos 135 a 464)) (SEQ ID NO: 144 del Listado de Secuencias).

25 FIG. 157. La FIG. 157 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la forma IgG del anticuerpo humano C2037 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 236)) (SEQ ID NO: 145 del Listado de Secuencias).

30 FIG. 158. La FIG. 158 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la forma IgG del anticuerpo humano C3048 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 a 472)) (SEQ ID NO: 146 del Listado de Secuencias).

FIG. 159. La FIG. 159 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la forma IgG del anticuerpo humano C3048 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 236)) (SEQ ID NO: 147 del Listado de Secuencias).

35 FIG. 160. La FIG. 160 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la forma IgG del anticuerpo humano C3015 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 140), región constante (posiciones de aminoácidos 141 a 470)) (SEQ ID NO: 148 del Listado de Secuencias).

FIG. 161. La FIG. 161 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la forma IgG del anticuerpo humano C3015 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 126), región constante (posiciones de aminoácidos 127 a 232)) (SEQ ID NO: 149 del Listado de Secuencias).

5 FIG. 162. La FIG. 162 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la forma IgG del anticuerpo humano C3022 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), región variable (posiciones de aminoácidos 20 a 134), región constante (posiciones de aminoácidos 135 a 464)) (SEQ ID NO: 150 del Listado de Secuencias).

10 FIG. 163. La FIG. 163 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la forma IgG del anticuerpo humano C3022 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 20), región variable (posiciones de aminoácidos 21 a 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 236)) (SEQ ID NO: 151 del Listado de Secuencias).

15 FIGS. 164A-164B. Las FIGS. 164A-164B son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de anticuerpo humano scFv contra la terminación amino de GPRC5D biotinilado humano (FIG. 164A) o de mono cynomolgus (FIG. 164B) por ELISA. El eje vertical representa la intensidad de luminiscencia evaluada por ELISA.

20 FIG. 165. La FIG. 165 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de una forma de IgG de un anticuerpo humano contra la terminación amino de GPRC5D biotinilado humano o de mono cynomolgus por ELISA. El eje vertical representa la intensidad de luminiscencia evaluada por ELISA.

25 FIG. 166. La FIG. 166 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de anticuerpo humano scFv contra una línea celular de cáncer que expresa GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

30 FIG. 167. La FIG. 167 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de una forma de IgG de un anticuerpo humano contra una línea celular de cáncer que expresa GPRC5D humano usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

30 FIG. 168. La FIG. 168 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 de rata C3-147 (SEQ ID NO: 152).

FIG. 169. La FIG. 169 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 de rata C3-147(SEQ ID NO: 153).

35 FIG. 170. La FIG. 170 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7000(58-867) (secuencia señal (posiciones de nucleótido 1 a 57), scFv (posiciones de nucleótido 58 a 783), etiqueta FLAG-His (posiciones de nucleótido 793 a 867)) (SEQ ID NO: 154).

FIG. 171. La FIG. 171 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3E-7034 (SEQ ID NO: 155).

FIG. 172. La FIG. 172 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región

variable de cadena ligera de C3E-7034 (SEQ ID NO: 156).

FIG. 173. La FIG. 173 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7034(58-864) (secuencia señal (posiciones de nucleótido 1 a 57), scFv (posiciones de nucleótido 61 to 786), etiqueta FLAG-His (posiciones de nucleótido 790 a 864)) (SEQ ID NO: 157).

5 FIG. 174. La FIG. 174 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7035 (SEQ ID NO: 158).

FIG. 175. La FIG. 175 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7035(58-864) (secuencia señal (posiciones de nucleótido 1 a 57), scFv (posiciones de nucleótido 61 a 786), etiqueta FLAG-His (posiciones de nucleótido 790 a 864)) (SEQ ID NO: 159).

10 FIG. 176. La FIG. 176 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7036 (SEQ ID NO: 160).

FIG. 177. La FIG. 177 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7036(58-858) (secuencia señal (posiciones de nucleótido 1 a 57), scFv (posiciones de nucleótido 61 a 780), etiqueta FLAG-His (posiciones de nucleótido 784 a 858)) (SEQ ID NO: 161).

15 FIG. 178. La FIG. 178 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica un vector de expresión pC2037-C3E7034 (SEQ ID NO: 162).

FIG. 179. La FIG. 179 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3048-C3E-7034 (SEQ ID NO: 163).

20 FIG. 180. La FIG. 180 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3022-C3E-7034 (SEQ ID NO: 164).

FIG. 181. La FIG. 181 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC2037-C3E-7035 (SEQ ID NO: 165).

FIG. 182. La FIG. 182 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3048-C3E-7035 (SEQ ID NO: 166).

25 FIG. 183. La FIG. 183 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3022-C3E-7035 (SEQ ID NO: 167).

FIG. 184. La FIG. 184 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC2037-C3E-7036 (SEQ ID NO: 168).

30 FIG. 185. La FIG. 185 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3048-C3E-7036 (SEQ ID NO: 169).

FIG. 186. La FIG. 186 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ORF de un vector de expresión pC3022-C3E-7036 (SEQ ID NO: 170).

35 FIG. 187. La FIG. 187 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C2037-C3E-7034 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C2037 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7034 (posiciones de aminoácidos 266 a 507)) (SEQ ID NO: 171).

FIG. 188. La FIG. 188 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3048-C3E-7034 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3048 (posiciones de aminoácidos 21 a 268), C3E-7034 (posiciones de aminoácidos 274 a 515)) (SEQ ID NO: 172).

FIG. 189. La FIG. 189 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3022-C3E-7034 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3022 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7034 (posiciones de aminoácidos 266 a 507)) (SEQ ID NO: 173).

FIG. 190. La FIG. 190 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C2037-C3E-7035 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C2037 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7035 (posiciones de aminoácidos 266 a 507)) (SEQ ID NO: 174).

FIG. 191. La FIG. 191 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3048-C3E-7035 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3048 (posiciones de aminoácidos 21 a 268), C3E-7035 (posiciones de aminoácidos 274 a 515)) (SEQ ID NO: 175).

FIG. 192. La FIG. 192 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3022-C3E-7035 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3022 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7035 (posiciones de aminoácidos 266 a 507)) (SEQ ID NO: 176).

FIG. 193. La FIG. 193 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C2037-C3E-7036 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C2037 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7036 (posiciones de aminoácidos 266 a 505)) (SEQ ID NO: 177).

FIG. 194. La FIG. 194 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3048-C3E-7036 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3048 (posiciones de aminoácidos 21 a 268), C3E-7036 (posiciones de aminoácidos 274 a 513)) (SEQ ID NO: 178).

FIG. 195. La FIG. 195 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3022-C3E-7036 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 19), C3022 (posiciones de aminoácidos 21 a 260), C3E-7036 (posiciones de aminoácidos 266 a 505)) (SEQ ID NO: 179).

FIG. 196. La FIG. 196 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de una molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 contra células que expresan GPRC5D humano endógeno (línea celular de linfoma humano A4/células FuK) usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 197. La FIG. 197 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 contra células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 198. La FIG. 198 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 contra CD3 humana (PBMC) usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 199. La FIG. 199 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 contra CD3 de mono cynomolgus (PBMC) usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 200. La FIG. 200 es un diagrama que muestra que la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 tiene actividad citotóxica contra células que expresan GPRC5D humano endógeno (línea celular de linfoma humano A4/células FuK).

FIG. 201. La FIG. 201 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de 2B1 humanizado contra GPRC5D de mono cynomolgus usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 202. La FIG. 202 es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de 7B4 humanizado contra GPRC5D de mono cynomolgus usando un citómetro de flujo (FACS). El eje vertical representa un valor relativo de la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

FIG. 203. La FIG. 203 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7034 (posiciones de aminoácidos 1 a 269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244 a 269)) (SEQ ID NO: 180).

FIG. 204. La FIG. 204 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7035(posiciones de aminoácidos 1 a 269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244 a 269)) (SEQ ID NO: 181).

FIG. 205. La FIG. 205 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7036(posiciones de aminoácidos 1 a 267). VH(2-119), VL(135-241), etiqueta FLAG-His (242 a 267)) (SEQ ID NO: 182).

FIG. 206. La FIG. 206 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C3E-7000 (SEQ ID NO: 183).

FIG. 207. La FIG. 207 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C3E-7000 (SEQ ID NO: 184).

FIG. 208. La FIG. 208 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C3E-7000 (SEQ ID NO: 185).

FIG. 209. La FIG. 209 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C3E-7000 (SEQ ID NO: 186).

FIG. 210. La FIG. 210 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C3E-7000 (SEQ ID NO: 187).

FIG. 211. La FIG. 211 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C3E-7000 (SEQ ID NO: 188).

FIG. 212. La FIG. 212 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CD3ε humana (SEQ ID NO: 189).

FIG. 213. La FIG. 213 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de E1018 (SEQ ID NO: 190).

FIG. 214. La FIG. 214 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de E1018 (SEQ ID NO: 191).

FIG. 215. La FIG. 215 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de E1018 (SEQ ID NO: 192).

FIG. 216. La FIG. 216 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de E1018 (SEQ ID NO: 193).

5 FIG. 217. La FIG. 217 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de D1012 (SEQ ID NO: 194).

FIG. 218. La FIG. 218 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de D1012 (SEQ ID NO: 195).

10 FIG. 219. La FIG. 219 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de D1012 (SEQ ID NO: 196).

FIG. 220. La FIG. 220 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de D1012 (SEQ ID NO: 197).

15 FIG. 221. La FIG. 221 es un diagrama que muestra constantes de disociación determinadas al ensayar la actividad de enlace de los anticuerpos anti-GPRC5D (C3022, E1018, C3048, y D1012) contra GPRC5D humano por SPR.

FIG. 222. La FIG. 222 es un diagrama que muestra la secuencia nucleica de h2B1_Fab_HC_1 (SEQ ID NO: 198).

20 FIG. 223. La FIG. 223 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_HC_1 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 a 146), región constante (posiciones de aminoácidos 147 al 475)) (SEQ ID NO: 199).

FIG. 224. La FIG. 224 es un diagrama que muestra la secuencia nucleica de h2B1_Fab_HC_2 (SEQ ID NO: 200).

25 FIG. 225. La FIG. 225 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_HC_2 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 a 146), región constante (posiciones de aminoácidos 147 al 475)) (SEQ ID NO: 201).

FIG. 226. La FIG. 226 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de h2B1_Fab_LC_1 (SEQ ID NO: 202).

30 FIG. 227. La FIG. 227 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_LC_1 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 al 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 237)) (SEQ ID NO: 203).

FIG. 228. La FIG. 228 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de h2B1_Fab_LC_2 (SEQ ID NO: 204).

35 FIG. 229. La FIG. 229 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_LC_2 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 al 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 237)) (SEQ ID NO: 205).

FIG. 230. La FIG. 230 es un diagrama que muestra la secuencia nucleica de C3E-7034_Fab_HC (SEQ ID NO: 206).

FIG. 231. La FIG. 231 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-

7034_Fab_HC (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 25 al 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 al 471)) (SEQ ID NO: 207).

FIG. 232. La FIG. 232 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-7034_Fab_LC (SEQ ID NO: 208).

5 FIG. 233. La FIG. 233 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7034_Fab_LC (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 al 132), región constante (posiciones de aminoácidos 133 al 238)) (SEQ ID NO: 209).

FIG. 234. La FIG. 234 es un diagrama que muestra la secuencia nucleica de C3E-7036_Fab_HC (SEQ ID NO: 210).

10 FIG. 235. La FIG. 235 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7036_Fab_HC (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 25 al 142), región constante (posiciones de aminoácidos 143 al 471)) (SEQ ID NO: 211).

FIG. 236. La FIG. 236 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-7036_Fab_LC (SEQ ID NO: 212).

15 FIG. 237. La FIG. 237 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7036_Fab_LC (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 al 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 236)) (SEQ ID NO: 213).

FIG. 238. La FIG. 238 es un diagrama que muestra la secuencia nucleica de h2B1_Fab_HC_3 (SEQ ID NO: 214).

20 FIG. 239. La FIG. 239 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_HC_3 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 a 146), región constante (posiciones de aminoácidos 147 al 475)) (SEQ ID NO: 215).

FIG. 240. La FIG. 240 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de h2B1_Fab_LC_3 (SEQ ID NO: 216).

25 FIG. 241. La FIG. 241 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_LC_3 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de aminoácidos 24 al 130), región constante (posiciones de aminoácidos 131 al 237)) (SEQ ID NO: 217).

FIG. 242. La FIG. 242 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-7034_scFv_Fc (SEQ ID NO: 218).

30 FIG. 243. La FIG. 243 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7034_scFv_Fc (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 266)) (SEQ ID NO: 219).

FIG. 244. La FIG. 244 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-7036_scFv_Fc (SEQ ID NO: 220).

35 FIG. 245. La FIG. 245 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7036_scFv_Fc (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 264)) (SEQ ID NO: 221).

FIG. 246. La FIG. 246 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de 2B1_scFv_Fc

humanizado (h2B1_scFv_Fc) (SEQ ID NO: 222).

FIG. 247. La FIG. 247 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de _2B1_scFv_Fc humanizado (h2B1_scFv_Fc) (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 271)) (SEQ ID NO: 223).

5 FIGS. 248A-248C. Las FIGS. 248A-248C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de una molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc contra células que expresan GPRC5D humano endógeno mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

10 Las FIG. 248A, FIG. 248B, y FIG. 248C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica del tipo FSA, tipo híbrido y tipo doble respectivamente.

FIGS. 249A-249C. Las FIGS. 249A-249C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de una molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc contra células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

15 Las FIG. 249A, FIG. 249B, y FIG. 249C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica de tipo FSA, tipo híbrido y tipo doble respectivamente.

FIGS. 250A-250C. Las FIGS. 250A-250C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc contra células que expresan CD3 humana mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

20 Las FIG. 250A, FIG. 250B, y FIG. 250C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica de tipo FSA, tipo híbrido y tipo doble respectivamente.

FIGS. 251A-251C. Las FIGS. 251A-251C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc contra células que expresan CD3 de mono cynomolgus mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

25 Las FIG. 251A, FIG. 251B, y FIG. 251C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica del tipo FSA, tipo híbrido y tipo doble respectivamente.

FIGS. 252A-252C. Las FIGS. 252A-252C son diagramas que muestran la actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc.

30 Las FIG. 252A y FIG. 252B son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica del tipo FSA y tipo híbrido respectivamente.

FIG. 252C. La FIG. 252C es un diagrama que muestra la actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc.

35 La FIG. 252C es un diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de molécula biespecífica de tipo doble.

FIG. 253. La FIG. 253 es un diagrama que muestra la actividad antitumoral de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido que contiene Fc en modelo de co-injerto de

tumor/PBMC.

FIG. 254. La FIG. 254 es un diagrama que muestra la actividad anti-tumoral de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido que contiene Fc en modelo transferido de PBMC humana.

5 FIG. 255. La FIG. 255 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8015 (SEQ ID NO: 224).

FIG. 256. La FIG. 256 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8015 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 264)) (SEQ ID NO: 225).

10 FIG. 257. La FIG. 257 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8017 (SEQ ID NO: 226).

FIG. 258. La FIG. 258 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8017 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 266)) (SEQ ID NO: 227).

15 FIG. 259. La FIG. 259 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8018 (SEQ ID NO: 228).

FIG. 260. La FIG. 260 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8018 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 266)) (SEQ ID NO: 229).

20 FIG. 261. La FIG. 261 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8025 (SEQ ID NO: 230).

FIG. 262. La FIG. 262 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8025 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 264)) (SEQ ID NO: 231).

25 FIG. 263. La FIG. 263 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8027 (SEQ ID NO: 232).

FIG. 264. La FIG. 264 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8027 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 266)) (SEQ ID NO: 233).

30 FIG. 265. La FIG. 265 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de C3E-8028 (SEQ ID NO: 234).

FIG. 266. La FIG. 266 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-8028 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), scFv (posiciones de aminoácidos 24 al 266)) (SEQ ID NO: 235).

35 FIG. 267. La FIG. 267 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de h2B1_Fab_HC_4 (SEQ ID NO: 236).

FIG. 268. La FIG. 268 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de h2B1_Fab_HC_4 (secuencia señal (posiciones de aminoácidos 1 a 23), región variable (posiciones de

aminoácidos 24 a 146), región constante (posiciones de aminoácidos 147 a 476)) (SEQ ID NO: 237).

FIGS. 269A-269C. Las FIGS. 269A-269C son diagrama que muestra los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal contra células que expresan GPRC5D humano endógeno mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

Las FIG. 269A, FIG. 269B, y FIG. 269C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de (C5D-0004 y C5D-0014), (C5D-0005 y C5D-0015) y (C5D-0006 y C5D-0016) respectivamente.

FIGS. 270A-270C. Las FIGS. 270A-270C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal contra células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

Las FIG. 270A, FIG. 270B, y FIG. 270C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de (C5D-0004 y C5D-0014), (C5D-0005 y C5D-0015) y (C5D-0006 y C5D-0016) respectivamente.

FIGS. 271A-271C. Las FIGS. 271A-271C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal contra células que expresan CD3 humana mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

Las FIG. 271A, FIG. 271B, y FIG. 271C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de (C5D-0004 y C5D-0014), (C5D-0005 y C5D-0015) y (C5D-0006 y C5D-0016) respectivamente.

FIGS. 272A-272C. Las FIGS. 272A-272C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal contra células que expresan CD3 de mono cynomolgus mediante citometría de flujo. El eje vertical representa la intensidad de fluorescencia media evaluada mediante citometría de flujo.

Las FIG. 272A, FIG. 272B, y FIG. 272C son diagramas que muestran los resultados de pruebas de actividad de enlace de (C5D-0004 y C5D-0014), (C5D-0005 y C5D-0015) y (C5D-0006 y C5D-0016) respectivamente.

FIGS. 273A-273B. Las FIGS. 273A-273B son diagramas que muestran la actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal.

La FIG. 273A y FIG. 273B son diagramas que muestran la actividad citotóxica de C5D-0004 y C5D-0014 respectivamente.

FIGS. 273C-273D. Las FIGS. 273C-273D son diagramas que muestran la actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal.

Las FIG. 273C y FIG. 273D son diagramas que muestran la actividad citotóxica de C5D-0005 y C5D-0015 respectivamente.

FIGS. 273E-273F. Las FIGS. 273E-273F son diagramas que muestran la actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal.

Las FIG. 273E y FIG. 273F son diagramas que muestran la actividad citotóxica de C5D-0006 y C5D-0016 respectivamente.

FIG. 274. La FIG. 274 es un diagrama que muestra la actividad antitumoral de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR en el modelo de co-injerto de tumor/PBMC.

FIGS. 275A-275B. Las FIGS. 275A-275B son diagramas que muestran la actividad de regresión tumoral de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR (FIG. 275A) y de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal (FIG. 275B) en el modelo de tumor establecido en ratones reconstituidos con PBMC humanas.

Las FIG. 275A y FIG. 275B son diagramas que muestran la actividad de regresión tumoral de C5D-0004 y C5D-0014 respectivamente.

FIG. 276. La FIG. 276 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada modificada por CDR (SEQ ID NO: 238).

FIG. 277. La FIG. 277 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera modificada por CDR (SEQ ID NO: 239).

FIG. 278. La FIG. 278 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un C3E-7034 modificado por CDR (SEQ ID NO: 240).

FIG. 279. La FIG. 279 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7034 modificado por CDR (SEQ ID NO: 241).

FIG. 280. La FIG. 280 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7035 modificado por CDR (SEQ ID NO: 242).

FIG. 281. La FIG. 281 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7036 modificado por CDR (SEQ ID NO: 243).

FIG. 282. La FIG. 282 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7078(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 244).

FIG. 283. La FIG. 283 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7085(1-267). VH(2-119), VL(135-241), etiqueta FLAG-His (242-267)(SEQ ID NO: 245).

FIG. 284. La FIG. 284 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7086(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 246).

FIG. 285. La FIG. 285 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7087(1-269). VH(2-119),

VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 247).

FIG. 286. La FIG. 286 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7088(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 248).

FIG. 287. La FIG. 287 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7089(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His(244-269)(SEQ ID NO: 249).

FIG. 288. La FIG. 288 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7090(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 250).

FIG. 289. La FIG. 289 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7091(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 251).

FIG. 290. La FIG. 290 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7092(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 252).

FIG. 291. La FIG. 291 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7093(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 253).

FIG. 292. La FIG. 292 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7094(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 254).

FIG. 293. La FIG. 293 muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7095(1-269). VH(2-119), VL(135-243), etiqueta FLAG-His (244-269)(SEQ ID NO: 255).

Descripción Detallada de la Invención

1. Definiciones

En la presente invención, el término "gen" significa un nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos de una proteína, o su hebra complementaria. El "gen" significa que incluye, por ejemplo, un polinucleótido, un oligonucleótido, ADN, ARNm, ADNc, y ARNc como el polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos de una proteína, o su hebra complementaria. Tal gen es un nucleótido de una sola hebra, de doble hebra, o triple o de más hebras. El "gen" también significa que incluye una asociación con las hebras de ADN y ARN, una mezcla de ribonucleótidos (RNAs) y desoxirribonucleótidos (DNAs) en una hebra de nucleótido, y un nucleótido de hebra doble o triple o con más hebras que comprende tal hebra de nucleótido. En la presente invención, "una secuencia base" tiene el mismo significado como "una secuencia de nucleótidos."

En la presente invención, el término "polinucleótido" tiene el mismo significado como un "ácido nucleico" y una "molécula de ácido nucleico" y significa también que incluye, por ejemplo, ADN, ARN, una sonda, un oligonucleótido, y un cebador. Tal polinucleótido es un polinucleótido de hebra sencilla, de hebra doble, o triple o con más hebras. El "polinucleótido" también quiere decir que incluye una asociación de hebras de ADN y ARN, una mezcla de ribonucleótidos (ARNs) y desoxirribonucleótidos (ADNs) en una hebra de polinucleótido, y una asociación de dos hebras o tres o más hebras que comprenden tal hebra de polinucleótido.

En la presente invención, los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" tienen el mismo significado.

En la presente invención, el término "antígeno" tiene el mismo significado como "inmunógeno".

En la presente invención, el término "célula" también incluye, por ejemplo, diversas células derivadas de animales individuales, células subcultivadas, células primarias cultivadas, líneas celulares, células recombinantes, y células microbianas.

En la presente invención, el término "anticuerpo" tiene el mismo significado como una inmunoglobulina. Sin embargo, el "anticuerpo" usado para el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención significa una inmunoglobulina que tiene regiones constantes y variables. El anticuerpo no está particularmente limitado y puede ser una inmunoglobulina natural o puede ser una inmunoglobulina producida por síntesis parcial o completa. El anticuerpo anti-GPRC5D y/o el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención está incluido en la "molécula" descrita más adelante.

La estructura básica de un anticuerpo cuaternario está constituida por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está ligada a la cadena pesada por un enlace disulfuro covalente. Las dos cadenas pesadas están ligadas una con la otra por uno o más enlace(s) disulfuro de acuerdo con los isotipos de las cadenas pesadas. Cada una de las cadenas ligera y pesada tiene enlaces disulfuro dentro de las cadenas regularmente espaciados. Cada una de las cadenas ligera y pesada contiene una región constante la cual muestra un grado muy alto de similitud de secuencia de aminoácidos y una región variable la cual muestra un bajo grado de similitud de secuencia de aminoácidos. La cadena ligera tiene una región variable (VL) en la terminación amino seguida por una región constante (CL). La cadena pesada tiene una región variable (VH) en la terminación amino seguida por tres regiones constantes (CH1, CH2, y CH3). VL y VH están apareados uno con el otro, y CL está alineada con la primera región constante (CH1) de la cadena pesada. El par de VL y VH forma un sitio de enlace único de antígeno.

Fab está compuesto de la cadena pesada CH1 seguida por VH, y la cadena ligera CL seguida por VL. VH y VL contienen cada una regiones determinantes de la complementariedad (CDRs).

Fc está constituido por las regiones en el terminal carboxilo de las regiones constantes de cadena pesada y es un dímero que contiene CH2 y CH3. El Fc de la presente invención puede ser Fc que tiene una secuencia natural (Fc natural) o puede ser una forma mutada de Fc que contiene una mutación en la secuencia natural (Fc mutado).

Ejemplos del "Fc mutado" pueden incluir, pero no se limitan a una región Fc modificada comprendida en un heteromultímero (incluyendo una región Fc heterodimérica) con estabilidad aumentada descrita en WO2013/063702; Fc que comprende el dominio CH3 de una inmunoglobulina derivada de un anticuerpo IgG el cual tiene "protuberancia" y "cavidad" e incluido en el heteromultímero descrito en WO96/27011; Fc que comprende el dominio CH3 incluido en el heterodímero el cual es electrostáticamente favorable logrado al reemplazar uno o más de los residuos de aminoácido con un aminoácido cargado descrito en WO2009/089004; regiones heterodiméricas Fe comprendidas en un heterodímero el cual es una variante estérica y/o variante pi (punto isoelectrico) descrito en WO2014/110601; Fc heterodimérico que comprende el dominio CH3 que erradica o reduce el enlace a la

Proteína A descrita en WO2010/151792.

La región variable está compuesta de regiones, denominadas regiones hipervariables (HVRs), que tienen variabilidad extrema, y relativamente regiones invariables, denominadas regiones de estructura (FRs), interrumpidas por las regiones hipervariables. Las regiones variables naturales de cadena ligera y pesada contienen cada una cuatro FRs conectadas por tres regiones hipervariables. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen en proximidad cercana junto con las regiones hipervariables de otra cadena por FRs y contribuyen a la formación de un sitio de enlace de antígeno en el anticuerpo.

Las cadenas ligera y pesada de una molécula de anticuerpo se sabe que tienen cada una tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Las regiones determinantes de la complementariedad se denominan también dominios hipervariables. Estas regiones se localizan en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. Estos sitios tienen una estructura primaria particularmente altamente variable y se separan usualmente en tres posiciones en las estructuras primarias respectivas de las hebras de polipéptido de cadena ligera y pesada. En la presente invención, las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo se refieren como la CDR1 de cadena pesada (CDRH1), la CDR2 de cadena pesada (CDRH2), y la CDR3 de cadena pesada (CDRH3) a partir de la terminación amino de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada para las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada y como la CDR1 de cadena ligera (CDRL1), la CDR2 de cadena ligera (CDRL2), y la CDR3 de cadena ligera (CDRL3) a partir de la terminación amino de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera para las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera. Estos sitios están próximos uno al otro sobre la estructura tridimensional y determinan la especificidad para el antígeno a enlazarse.

En la presente invención, las posiciones y tramos de CDRs se determinaron de acuerdo con la definición de IMGT (Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55-77).

Las regiones de estructura (FRs) son regiones variables excepto por los residuos CDR. Cada región variable tiene generalmente cuatro FRs: FR1, FR2, FR3, y FR4. Las FRs de cadena ligera y pesada se refieren como FRH1, FRH2, FRH3, y FRH4, y FRL1, FRL2, FRL3, y FRL4, respectivamente.

Las CDRs y las FRs contenidas en las cadenas ligeras y pesadas se posicionan como FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 y FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 en este orden desde la terminación amino hacia la terminación carboxilo. Las CDRs y las FRs contenidas en las cadenas ligeras y pesadas se posicionan como FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 y FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 en este orden desde la terminación amino hacia la terminación carboxilo.

Las posiciones de CDRs y FRs pueden determinarse también de acuerdo con diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, la definición de IMGT así como Kabat, Chothia, AbM, contacto, etc.

En la presente invención, el término "fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo" significa un fragmento parcial de anticuerpo que está constituido por regiones variables de cadenas ligera y pesada y

tiene actividad de enlace contra el antígeno. Ejemplos del "fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo" puede incluir, pero no se limitan a, fragmentos de enlace de antígenos tales como Fab, F(ab')₂, scFv, Fab', Fv, y anticuerpo de dominio sencillo (sdAb). Tal fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo puede ser obtenido mediante el tratamiento de una molécula de longitud completa de la proteína del anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina o puede ser una proteína recombinante producida en una célula hospedera apropiada usando un gen recombinante.

En la presente invención, el "sitio" al cual un anticuerpo se enlaza, es decir, el "sitio" reconocido por un anticuerpo, significa un péptido parcial o conformación parcial sobre un antígeno enlazado o reconocido por el anticuerpo.

En la presente invención, tal sitio se refiere también como un epítopo o un sitio de enlace a anticuerpo.

En la presente invención, el término "mutante de anticuerpo" significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original por la sustitución, delección, y/o adición (la adición incluye inserción) (posteriormente, referidas en conjunto como una "mutación") de aminoácido(s) y enlaza al antígeno. El número de aminoácidos mutados en tal mutante de anticuerpo es 1 a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, o 50. Tal mutante de anticuerpo está abarcado también por el "anticuerpo" de la presente invención.

En la presente invención, el término "varios" en "1 a varios" se refiere a 2 a 10.

En la presente especificación, el término "molécula" es una molécula que comprende el anticuerpo antes mencionado o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo y puede ser una molécula multiespecífica formada por anticuerpos o una pluralidad de fragmento de enlace de antígenos derivada de ello.

En la presente especificación, el término "molécula la cual es multiespecífica" tiene el mismo significado como una "molécula multiespecífica". Tal molécula multiespecífica no está particularmente limitada con tal de que la molécula sea capaz de enlazarse a una pluralidad de epítopos diferentes uno del otro en una molécula, y/o epítopos diferentes uno del otro sobre dos o más moléculas. La molécula la cual es multiespecífica también incluye un anticuerpo que comprende regiones de cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL). Ejemplos de tal molécula multiespecífica incluyen, pero no se limitan a, una molécula de anticuerpo de longitud completa que tiene dos o más tipos de cadenas pesadas y dos o más tipos de cadenas ligeras, es decir, una molécula multiespecífica de tipo IgG, y una molécula que consiste en dos o más tipos de fragmento de enlace de antígenos que tiene VLs y VHs, es decir, una molécula derivada por una combinación de Fab, Fab', Fv, scFv, sdAb, etc. (es decir, scFv en tándem, diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla, y triacuerpos). Además, una molécula formada al enlazar genéticamente o químicamente una proteína que tiene actividad de enlace a antígeno sin que tenga un esqueleto de inmunoglobulina, a un fragmento de enlace de antígeno está también incluida en la molécula multiespecífica.

Ejemplos de actividades o propiedades ejercidas por el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula multiespecífica de la presente

invención pueden incluir actividades biológicas y propiedades fisicoquímicas y pueden incluir específicamente diversas actividades biológicas, actividad de enlace contra un antígeno o un epítipo, estabilidad durante la producción o almacenamiento, y estabilidad térmica.

En la presente invención, la frase "que hibridiza bajo condiciones severas" significa hibridización bajo condiciones que involucran hibridización a 65°C en una solución que contiene 5 × SSC, seguido por lavado a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 2 × SSC-0.1% SDS, a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0.5 × SSC-0.1% SDS, y a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0.2 × SSC-0.1% SDS, o hibridización bajo condiciones equivalentes a ello. SSC significa una solución acuosa de NaCl 150 mM – citrato de sodio 15 mM, y n × SSC significa SSC con una concentración de n-múltiplos.

En la presente invención, el término "citotoxicidad" se refiere a algún cambio patológico producido a células en una manera o en otra y significa no solamente trauma directo sino cada daño estructural o funcional a las células, incluyendo escisión del ADN, formación de dímeros base, ruptura cromosómica, daño en el aparato mitótico, y reducción en las actividades de diversas enzimas.

En la presente invención, el término "actividad citotóxica" significa la actividad que provoca la citotoxicidad antes mencionada.

En la presente invención, el término "actividad por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo", también denominada "actividad ADCC", quiere decir el efecto o actividad de las células objetivo que dañan tales como células tumorales por células NK por medio de anticuerpos.

En la presente invención, el término "actividad citotóxica por la redirección de células T" significa que la citotoxicidad es provocada por medio de una molécula multiespecífica que comprende un anticuerpo antígeno anti-objetivo tal como un antígeno anti-tumoral y el anticuerpo anti-CD3. Preferiblemente, el término significa que el anticuerpo antígeno anti-tumoral enlaza a células tumorales objetivo mientras que el anticuerpo anti-CD3 enlaza a células T de manera que las células tumorales objetivo y las células T están cercanas una de la otra para inducir la citotoxicidad mediada por activación de células T. La molécula puede estar contenida en una composición farmacéutica.

En la presente invención, los términos "aminoácido que se presenta naturalmente" y "residuo de aminoácidos que se presenta naturalmente" significa Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu (E), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y), y Val (V) y sus residuos, y son también referidos como un "aminoácido natural" o un "residuo de aminoácido natural".

2. Proteína antigénica

2-1. Antígeno GPRC5D

En la presente invención, el término "GPRC5D" tiene el mismo significado como una proteína GPRC5D.

GPRC5D se clasifica dentro del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G y es una de las proteínas de GPCR humano recientemente encontradas por la búsqueda de homología de la base de datos EST usando las secuencias de aminoácidos de una serie de GPCRs humanos (Literatura

No de Patentes 1). Esta proteína ha sido registrada bajo los números de deposición del GenBank: AF209923, NM_018654, y NP_0611124. Sin embargo, las funciones fisiológicas o ligando fisiológico de GPRC5D, el subtipo de la proteína G (subunidad α) para acoplarse con ellos, etc., no han sido aún revelados.

5 2-2. Antígeno CD3

En la presente invención, el término "CD3" tiene el mismo significado como una proteína CD3.

CD3 se expresa como una porción de un complejo multimolecular del receptor de células T, sobre células T y es un complejo de 5 tipos de polipéptidos (cadenas γ , δ , ϵ , ζ , y η ; pesos moleculares: 25000 a 28000, 21000, 20000, 16000, y 22000, respectivamente).

10 Ejemplos del complejo CD3 incluye cadenas γ , δ , ϵ , ζ , y η . Estas también se denominan subunidades. Los anticuerpos anti-CD3 se enlazan a células T para inducir citotoxicidad mediada por la activación de células T. Muchos anticuerpos anti-CD3 enlazan a CD3 ϵ .

La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica CD3 ϵ humana está registrada en el GenBank bajo el número de acceso NM_000733.3. La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica
15 CD3 de mono cynomolgus esta registrada en el GenBank bajo el número de acceso NM_001283615.1. La secuencia de aminoácidos de CD3 ϵ humana se describe en SEQ ID NO: 189 del Listado de Secuencias.

2-3. Preparación de proteína antigénica

20 Cada proteína antigénica antes mencionada (GPRC5D o CD3 (posteriormente, GPRC5D y CD3 se refieren también en conjunto como la proteína antigénica) usada en la presente invención puede ser preparada mediante purificación o aislamiento de tejidos animales (incluyendo fluidos corporales), células derivadas de los tejidos, o cultivos de las células, recombinación génica, traducción *in vitro*, síntesis química, etc.

25 El ADNc de la proteína antigénica puede obtenerse mediante, por ejemplo, un denominado método por PCR el cual efectúa la reacción en cadena de polimerasa (posteriormente, referido como "PCR") (Saiki, R.K., et al., Science (1988) 239, 487-489) usando una biblioteca de ADNc de órganos que expresan el ARNm de la proteína antigénica como una plantilla y usando cebadores capaces de amplificar específicamente el ADNc de la proteína antigénica.

30 Un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones severas a un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína antigénica expresada en un ser humano o en una rata, y que codifica una proteína que tiene actividades biológicas equivalentes a la proteína antigénica se incluye también en el ADNc de la proteína antigénica.

Además, variantes de empalme transcritas de los loci génicos de la proteína antigénica expresada en un humano o en una rata, o polinucleótidos que hibridizan a ellas bajo condiciones severas
35 y que codifican una proteína que tiene actividades biológicas equivalentes a la proteína antigénica también se incluyen en el ADNc de la proteína antigénica.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína antigénica de humano o de rata o la

secuencia de aminoácidos del mismo excepto por una secuencia señal por la sustitución, delección, o adición de 1 a varios aminoácido(s) y tiene actividades biológicas equivalentes a la proteína antigénica se incluye también en la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína antigénica.

Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme transcrita desde los loci génicos de la proteína antigénica de humano o de rata o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por la sustitución, delección, o adición de 1 a varios aminoácido(s) y tiene propiedades biológicas equivalentes a la proteína antigénica también se incluye en la proteína antigénica.

2-4 Especificidad de enlace para la proteína antigénica

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo, etc. reconoce GPRC5D humano. En otras palabras, el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo, etc. enlaza a un antígeno GPRC5D y preferiblemente enlaza a GPRC5D de humano y a GPRC5D de mono, más preferiblemente GPRC5D de humano y GPRC5D de mono cynomolgus. El anticuerpo anti-GPRC5D humanizado h2B1 y el anticuerpo humano C3048 de la presente invención descrito posteriormente enlazan además a GPRC5D de mono cynomolgus además de GPRC5D humano.

El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del mismo, etc. contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención reconoce un antígeno CD3, es decir, se enlaza al mismo. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del mismo, etc. contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención preferiblemente enlaza a CD3 humana, CD3 de mono, y los similares y más preferiblemente enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus.

El anticuerpo que enlaza a proteínas antigénicas de humanos o monos cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del mismo se puede someter a diversas pruebas sobre eficacia o seguridad usando primates, particularmente, monos cynomolgus, útiles para el desarrollo no clínico (desarrollo preclínico) de productos farmacéuticos, y se prefiere de esta manera.

Mientras tanto, preferiblemente, el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención no enlaza a GPRC5D de ratón y/o de rata. Por lo tanto, por ejemplo, diversos ensayos o pruebas inmunohistoquímicas usando células de ratón transfectadas con genes de GPRC5D humano, tejidos o individuos (incluyendo animales transgénicos, animales con genes inactivados, y animales con transgénesis) y el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc. pueden llevarse a cabo sin estar influenciados por el GPRC5D de los ratones y/o ratas hospederos. De esta manera, el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc., se prefiere para la investigación y desarrollo no clínico, usando ratones, de fármacos, fármacos veterinarios, o fármacos de diagnóstico, etc., que comprende el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc.

De manera similar, preferiblemente, el anticuerpo anti-CD3 contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención no se enlaza a CD3 de ratón y/o rata. Por lo tanto, por ejemplo, diversos ensayos o pruebas inmunohistoquímicas usando células de ratón transfectadas con el gen de CD3 humano, tejidos, o individuos (incluyendo animales transgénicos, animales con genes inactivados, y

animales con transgénesis) y el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc. puede llevarse a cabo sin estar influenciado por la CD3 de los ratones y/o ratas hospederos. De esta manera, el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc., se prefiere para la investigación y desarrollo no clínico, usando ratones, de fármacos, fármacos veterinarios, o fármacos de diagnóstico, etc., que comprende el anticuerpo o la molécula multiespecífica de la presente invención, etc.

En la presente invención, el término "reconocimiento", es decir, "enlace", significa enlace el cual no es de adsorción no específica. Ejemplos de criterios para la determinación de si se alcanza o no el reconocimiento, es decir, se alcanza o no el enlace pueden incluir una constante de disociación (posteriormente, referida como " K_D "). Preferiblemente, el anticuerpo, etc. de la presente invención tiene un valor K_D de 1×10^{-5} M o inferior, 5×10^{-6} M o inferior, 2×10^{-6} M o inferior, o 1×10^{-6} M o inferior para CD3.

En la presente invención, el enlace del anticuerpo al antígeno puede ser ensayado o determinado usando un sistema de análisis de interacción biomolecular (por ejemplo, SPR o BLI), ELISA, o RIA, o similar. El enlace del anticuerpo al antígeno expresado sobre la superficie celular puede ser ensayado mediante citometría de flujo o lo similar.

El método SPR (análisis por resonancia de plasmón de superficie) se usa como una metodología de análisis para determinar una constante de disociación (valor K_D), etc. Como un índice para afinidad al medir una constante de velocidad de asociación (valor K_a) y una constante de velocidad de disociación (valor K_d) por análisis cinético. Ejemplos del equipo utilizado en el análisis SPR pueden incluir BIAcore(TM) (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), ProteOn(TM) (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.), SPR-Navi(TM) (fabricado por BioNavis Oy Ltd.), Spreeta(TM) (fabricado por Texas Instruments Inc.), SPRi-Plex II(TM) (fabricado por Horiba, Ltd.), y Autolab SPR(TM) (fabricado por Metrohm Japan Ltd.).

El BLI (interferometría de biocapas) es un método el cual involucra medir la interacción biomolecular usando interferencia de biocapas. Ejemplos del equipo usado en el análisis de interacción de BLI incluyen el sistema Octet (fabricado por Pall ForteBio Corp.).

El ELISA es un método el cual involucra capturar un antígeno o un anticuerpo de interés contenido en una solución de muestra usando un anticuerpo o antígeno específico, mientras se detecta y cuantifica el antígeno o anticuerpo de interés a través del uso de reacción enzimática. Un anticuerpo o antígeno etiquetado por enzimas se incorpora dentro del sistema de reacción y se detecta la actividad enzimática. Para la detección de la actividad enzimática, se usa un sustrato cuyo espectro de absorción se cambia por la reacción, y el espectro de absorción se digitaliza por medición de absorbancia.

El Cell-ELISA es un método el cual involucra capturar un analito en la superficie celular sobre una base celular, mientras se detecta y cuantifica el analito a través del uso de reacción enzimática.

El RIA (radio inmunoensayo) puede cuantificar un anticuerpo al etiquetar el anticuerpo con un material radioactivo y medir la radioactividad del anticuerpo.

La citometría de flujo es un enfoque para analizar ópticamente células individuales al dispersar

las células en un fluido y hacer fluir una corriente delgada del fluido. Un anticuerpo etiquetado con colorante fluorescente enlaza a un antígeno en la superficie celular a través de reacción de antígeno-anticuerpo, e intensidad por fluorescencia a partir del anticuerpo etiquetado enlazado con células se mide para cuantificar la actividad de enlace a antígeno del anticuerpo.

5 3. Anticuerpo anti-GPRC5D

3-1. Tipo de anticuerpo anti-GPRC5D

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención pueden ser ya sea anticuerpos monoclonales o policlonales. Ejemplos del anticuerpo policlonal pueden incluir una mezcla de tipos de anticuerpos plurales que difieren en una porción o en todos los conjuntos de CDR. Ejemplos del anticuerpo monoclonal pueden incluir anticuerpos derivados de animales no humanos (anticuerpos animales no humanos), anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados, etc.

Ejemplos del anticuerpo de animal no humano pueden incluir anticuerpos derivados de vertebrados tales como mamíferos y aves. Ejemplos del anticuerpo derivado de mamíferos pueden incluir anticuerpos derivados de roedores tales como anticuerpos de ratón y anticuerpos de rata. Ejemplos del anticuerpo derivado de aves pueden incluir anticuerpos del pollo. Ejemplos del anticuerpo monoclonal de rata GPRC5D anti-humano pueden incluir 2A4, 2B1 y 7B4 (Ejemplo 1) de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 5 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2B1 se muestra en SEQ ID NO: 7 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7B4 se muestra en SEQ ID NO: 9 del Listado de Secuencias.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 12 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2B1 se muestra en SEQ ID NO: 14 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7B4 se muestra en SEQ ID NO: 16 del Listado de Secuencias.

2A4, 2B1, y 7B4 tienen actividad ADCC (Ejemplo 2).

Ejemplos del anticuerpo quimérico pueden incluir un anticuerpo que comprende regiones variables derivadas de anticuerpos de animales no humanos que se enlazan con regiones constantes de anticuerpo humano (inmunoglobulina humana).

Ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-humano GPRC5D de rata 2A4 pueden incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 al 127 de SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 al 141 de SEQ ID NO: 26. Un ejemplo de tal anticuerpo quimérico derivado de 2A4 puede incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 al 234 de SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 a 471 de SEQ ID NO: 26. En la presente especificación, el anticuerpo se refiere como c2A4.

Ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-humano GPRC5D de rata 2B1

pueden incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 al 234 de SEQ ID NO: 30 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 al 472 de SEQ ID NO: 34. Un ejemplo de tal anticuerpo quimérico derivado de 2B1 puede

5 incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 al 234 de SEQ ID NO: 30 y una cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 al 472 de SEQ ID NO: 34. En la presente especificación, el anticuerpo se refiere como c2B1.

Ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-humano GPRC5D de rata 7B4 pueden incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de

10 cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 al 127 de SEQ ID NO: 38 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 al 142 de SEQ ID NO: 42. Un ejemplo de tal anticuerpo quimérico derivado de 7B4 puede incluir un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácido 21 a 233 de SEQ ID NO: 38 y una cadena pesada que consiste en los residuos de aminoácido 20 al 472 de

15 SEQ ID NO: 42. En la presente especificación, el anticuerpo se refiere como c7B4.

Ejemplos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo derivado de humano que contiene solamente regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) (Nature (1986) 321, 522-525), un anticuerpo humano injertado con las secuencias de CDR y con algunos de los residuos de aminoácido de regiones de estructura mediante injertado con CDR (publicación internacional No.

20 WO1990/007861)), y un anticuerpo que tiene aminoácido(s) de anticuerpo humano reemplazados por uno o dos o más aminoácido(s) derivados de anticuerpos de animales no humanos en cualquiera de estos anticuerpos humanizados.

El anticuerpo humanizado derivado de cada anticuerpo quimérico antes mencionado conserva todas las 6 secuencias de CDR derivadas del anticuerpo quimérico antes mencionado y por extensión, el

25 anticuerpo de rata, y tiene actividad ADCC. De esta manera, ejemplos del anticuerpo que mantiene todas las 6 secuencias de CDR mostradas a continuación incluyen anticuerpos de rata, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados.

La región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado derivado de 2A4 antes mencionado mantiene

30 la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 45 (GYTFTSYY),

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 (VYPGYGGT), y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

35 47 (ARRKGIIRGPGYFDY).

La región variable de cadena ligera del mismo mantiene

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 54 (EGISNS),

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 55 (GAS), y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 56 (QQGYKYPPT).

5 La región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado derivado de 2B1 antes mencionado mantiene

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48 (GFSLNTYDMG),

10 la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 49 (IWWDDDK), y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50 (ARIETVRVSRKGFH).

La región variable de cadena ligera del mismo mantiene

15 la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 57 (QSVGIN),

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58 (GAS), y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 59 (LQHGSIPPT).

20 La región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado derivado de 7B4 antes mencionado mantiene

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 51 (GYTITSGYD),

25 la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52 (MSYRGST), y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 53 (ALTRTYWYNYYYVLDA).

La región variable de cadena ligera del mismo mantiene

30 la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 60 (QNINKY),

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 61 (NTN), y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62 (LQRNSWYT).

35 Las secuencias de aminoácidos de las CDRs antes mencionadas se describen también en las FIG. 54 a 71.

En la presente invención, las posiciones y tramos de las CDRs se determinaron de acuerdo con la definición de IMGT (Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55-77).

Ejemplos preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por

- los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 64,
- 5 los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66,
- los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68,
- los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70,
- y
- los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72,
- 10 y
- una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por
- los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74,
- los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76,
- 15 los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78,
- y
- los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80.

Ejemplos alternativos preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende

- 20 una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por
- los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82,
- o
- los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84,
- y
- 25 una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por
- los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86,
- los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88,
- los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90,
- 30 y
- los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92.

Ejemplos específicos preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de

- 35 una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por
- los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 74,
- y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por
- los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 64,

y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72.

Ejemplos alternativos específicos preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, y

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 126 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

Ejemplos más preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende cualquier combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

5 aminoácido 21 al 234 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66,

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

10 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76, y una cadena ligera que comprende los residuos de

15 una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

20 aminoácido 21 al 234 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 68,

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

25 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 78, y una cadena ligera que comprende los residuos de

30 una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

35 aminoácido 21 al 234 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70, y

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 21 al 472 de la secuencia de

aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 234 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72.

Ejemplos alternativos más preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende cualquier combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 20 al 472 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 233 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84,

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 20 al 472 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 233 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84,

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 20 al 472 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 233 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82,

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 20 al 472 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 90, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 233 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84, y

una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido 20 al 472 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92, y una cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido 21 al 233 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82.

Los anticuerpos de rata, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos humanizados antes mencionados pueden contener cada uno Fc.

También, los anticuerpos de rata, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos humanizados antes mencionados pueden contener cada uno una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

Ejemplos adicionales más preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera antes mencionadas, preferiblemente la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado derivado de 2B1, y

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

- 5 iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217.

10 Ejemplos particularmente preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por
15 SEQ ID NO: 72, y que comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada
20 por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada
25 por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada
30 por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada
35 por SEQ ID NO: 217.

De estos, el anticuerpo más preferido puede incluir un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos

de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y que comprende

5 iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

10 o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217.

15 Ejemplos específicos de estos pueden incluir un anticuerpo que comprende

una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o
una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217.

25 Ejemplos alternativos adicionales más preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera antes mencionadas, preferiblemente la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado derivado de 2B1 y Fc natural o mutado.

30 Ejemplos particularmente preferidos de estos anticuerpos humanizados pueden incluir un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y Fc natural o mutado.

35 Ejemplos específicos de estos pueden incluir un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 271 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 223, y Fc natural o mutado.

El anticuerpo humano no está particularmente limitado con tal de que el anticuerpo enlace al GPRC5D humano. Ejemplos del mismo pueden incluir también al anticuerpo humano que enlaza al mismo sitio como en el caso del anticuerpo humanizado de la presente invención. Ejemplos del mismo incluyen un anticuerpo humano que enlaza al mismo sitio como en el caso de h2B1H2L5.

5 Ejemplos del anticuerpo humano de la presente invención incluyen un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera descritas en cualquiera de los siguientes ① a ④:

①

una región variable de cadena pesada que comprende

10 la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 111,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 112, y

15 la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 113,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 114,

20 la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 115, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 116,

②

25 una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 117,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 118, y

30 la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 119,

y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120,

35 la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 121, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

122,

③

una región variable de cadena pesada que comprende

la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

5 123,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

124, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

125,

10 y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

126,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

15 127, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

128, y

④

una región variable de cadena pesada que comprende

20 la CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

129,

la CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

130, y

la CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

25 131, y

una región variable de cadena ligera que comprende

la CDR1 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

132,

la CDR2 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

30 133, y

la CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

134.

Las secuencias de aminoácidos de las CDRs antes mencionadas se describen también en las FIG 124 a 147.

35 Ejemplos preferidos del anticuerpo humano pueden incluir un anticuerpo que comprende

una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97,

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101,

la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 105, y
la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109,
y

una región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de

- 5 la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99,
la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103,
la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 107, y
la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135
o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo.

- 10 Ejemplos específicos preferidos del anticuerpo humano pueden incluir un anticuerpo que
comprende cualquier combinación de una región variable de cadena pesada y una región variable de
cadena ligera de

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por
SEQ ID NO: 97, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 99,

- 15 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por
SEQ ID NO: 101, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 103,

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por
SEQ ID NO: 105, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 107, y

- 20 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por
SEQ ID NO: 109, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por SEQ ID NO: 135.

- 25 Tal anticuerpo incluye Fv de única cadena (también referido como scFv) (Ejemplo 10)-4).

Otro ejemplo del anticuerpo humano incluye un anticuerpo tipo IgG que comprende las regiones
variables de cadena ligera y pesada antes mencionadas ligadas a regiones de cadena ligera constante
(CL) y cadena pesada constante (CH1 y Fc) regiones de inmunoglobulina humana, respectivamente.

Ejemplos de tal anticuerpo humano tipo IgG incluyen un anticuerpo que comprende cualquier
combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de

- 30 una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144, y
una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145,
una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146, y
una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 147,
35 una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 148, y
una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 149, y
una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 150, y
una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 151.

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención puede ser un anticuerpo comprendido de porciones derivadas de una pluralidad de anticuerpos diferentes con tal de que el anticuerpo enlace al GPRC5D humano. Ejemplos de tal anticuerpo pueden incluir un anticuerpo que comprende cadenas pesada y/o ligera intercambiadas entre una pluralidad de anticuerpos diferentes, un anticuerpo que comprende cadenas pesada y/o ligera de longitud completa intercambiadas allí entre, un anticuerpo que comprende regiones constantes o variables intercambiadas allí entre, y un anticuerpo que comprende todas o algunas CDRs intercambiadas allí entre. Las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo quimérico pueden ser derivadas de diferentes anticuerpos anti-GPRC5D de la presente invención. La CDR1 de cadena pesada a CDR3 y la CDR1 de cadena ligera a CDR3 en las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo humanizado pueden ser derivadas de dos o más anticuerpos anti-GPRC5D diferentes de la presente invención. La CDR1 de cadena pesada a CDR3 y la CDR1 de cadena ligera a CDR3 en las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo humano pueden ser una combinación de CDRs llevadas por dos o más anticuerpos diferentes anti-GPRC5D de la presente invención.

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención incluye una inmunoglobulina de cadena única que comprende secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa del anticuerpo ligadas por medio de un enlazador apropiado (Lee, H-S, et al., *Molecular Immunology* (1999) 36, 61-71; y Shirrmann, T. et al., *mAbs* (2010), 2 (1), 1-4). Tal inmunoglobulina de cadena única puede dimerizarse para con ello mantener una estructura y actividades similares a aquellas del anticuerpo, el cual es originalmente un tetrámero.

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo también incluye un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones severas a una hebra complementaria de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, y enlaza a GPRC5D humano.

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo puede ser un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y/o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o más idéntica a la(s) secuencia(s) de aminoácidos contenida en el anticuerpo antes mencionado o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (8) a (12) y (18) a (20), y enlaza a GPRC5D humano.

Comparado con las posiciones y tramos de regiones variables de cadena ligera usando una definición de IMGT, las posiciones y tramos de regiones variables de cadena ligera usando una definición diferente a la de IMGT pueden contener adicionalmente uno o dos o más aminoácido(s), por ejemplo, arginina (R) y/o glicina (G), en las terminaciones carboxilo de las secuencias de aminoácidos de las

regiones variables de cadena ligera. Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del mismo que tiene tal región variable de cadena ligera también está cubierto por el anticuerpo de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo.

La capacidad del anticuerpo, etc. de la presente invención para enlazar a GPRC5D, particularmente, GPRC5D humano y/o de mono cynomolgus, puede optimizarse al introducir una mutación al fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención. Ejemplos específicos del método para introducir una mutación pueden incluir mutagénesis aleatoria usando PCR propensa a error, mutagénesis de aminoácidos dirigida al sitio usando una biblioteca NNK, mutagénesis dirigida al sitio usando información de estructura, y combinaciones de los mismos.

3-2. Mutante de anticuerpo de anticuerpo anti-GPRC5D

El mutante de anticuerpo del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención puede mostrar preferiblemente, por ejemplo, sensibilidad reducida a la degradación u oxidación de proteínas, una actividad o función biológica preservada o mejorada o función o reducción suprimida o cambio en la actividad o función biológica, una capacidad ajustada o mejorada para enlazar al antígeno, o propiedades fisicoquímicas o funcionales impartidas a ello. Las proteínas se conocen por variar en sus funciones o actividades debido a un cambio en la cadena lateral de aminoácidos en particular presente sobre la superficie de las mismas. Ejemplos de tal caso incluyen la desamidación de una cadena lateral de asparagina y la isomerización de una cadena lateral de ácido aspártico. Un anticuerpo derivado del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención mediante reemplazo con otro aminoácido con objeto de evitar tal cambio en la cadena lateral de aminoácido también se incluye en el alcance del mutante de anticuerpo de la presente invención.

Ejemplos del mutante de anticuerpo de la presente invención pueden incluir un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original por sustitución conservadora de aminoácidos. La sustitución conservadora de aminoácidos es una sustitución que se presenta en un grupo de aminoácidos relacionado con cadenas laterales de aminoácidos.

Los grupos de aminoácidos preferidos son como siguen: un grupo ácido incluyendo ácido aspártico y ácido glutámico; un grupo básico incluyendo lisina, arginina, y histidina; un grupo no polar incluyendo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, y triptofano; y una familia polar sin carga incluyendo glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, y tirosina. Otros grupos de aminoácidos preferidos son como siguen: un grupo hidroxil alifático incluyendo serina y treonina; un grupo que contiene amida incluyendo asparagina y glutamina; un grupo alifático incluyendo alanina, valina, leucina, e isoleucina; y un grupo aromático incluyendo fenilalanina, triptofano, y tirosina. Tal sustitución de aminoácidos en el mutante de anticuerpo se lleva a cabo preferiblemente sin reducir la actividad de enlace a antígeno del anticuerpo original.

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención, el fragmento de enlace de antígeno del mismo, la variante del mismo, o la molécula de la presente invención también abarcan: un mutante de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención tal como 2A4, 2B1, o 7B4 por sustitución conservadora de

aminoácidos y/o cualquier otra mutación, y enlaza a GPRC5D humano, un fragmento de enlace de antígeno del mismo, una molécula que comprende el mutante de anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno, etc.; un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano que comprende una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos en la cual la sustitución conservadora de aminoácidos y/o cualquier otra mutación que se presente en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de CDRH1 a CDRH3 y CDRL1 a CDRL3 derivada del anticuerpo de la presente invención tal como 2A4, 2B1, o 7B4, y enlaza a GPRC5D humano, un fragmento de enlace de antígeno del mismo, una molécula que comprende el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno, etc.; un mutante de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención tal como C2037, C3048, C3015, o C3022 por sustitución conservadora de aminoácidos, y enlaza a GPRC5D humano, un fragmento de enlace de antígeno del mismo, una molécula que comprende el mutante de anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno, etc.; y un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano que comprende una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos en la cual se presenta una mutación conservadora de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de CDRH1 a CDRH3 y CDRL1 a CDRL3 derivada del anticuerpo de la presente invención tal como C2037, C3048, C3015, o 3022, y enlaza a GPRC5D humano, un fragmento de enlace de antígeno del mismo, una molécula que comprende el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno, etc.

3-3. Fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-GPRC5D

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención. El fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención abarca fragmento de enlace de antígenos de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos. El fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo significa un fragmento que mantiene por lo menos actividad de enlace a antígeno entre las funciones del anticuerpo, o una forma modificada del mismo. Ejemplos de tales funciones del anticuerpo pueden incluir generalmente actividad de enlace a antígeno, actividad reguladora de la actividad de antígeno (por ejemplo, actividad agonista), actividad de internalizar un antígeno dentro de las células, y actividad de inhibir o promover la interacción entre un antígeno y su sustancia de interacción.

El fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo no está limitado particularmente con tal de que el fragmento del anticuerpo mantenga por lo menos actividad de enlace a antígeno entre las actividades del anticuerpo. Ejemplos de tal fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab (scFab) de cadena sencilla que comprende la terminación carboxi de una cadena ligera Fab y la terminación amino de una cadena pesada Fab ligada por un enlazador apropiado, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende Fvs de cadena ligera y pesada ligados por medio de un enlazador apropiado, y anticuerpo de dominio sencillo (sdAb; también denominado nanocuerpo) que tiene una región variable de cadena pesada sencilla y que carece de una secuencia de cadena ligera (Muyldemans S. et al., *Protein Eng.*, (1994), 7 (9), 1129-35; y Hamers-Casterman C. et al., *Nature* (1993), 363 (6428), 446-448). El fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de la presente

invención también significa incluir una molécula que comprende el fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de la presente invención así como otras porciones, tales como scFab y scFv que retienen una porción de enlazador.

3-4 Forma modificada de anticuerpo anti-GPRC5D o fragmento de enlace de antígeno del mismo y conjugados

La presente invención proporciona una forma modificada del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo. La forma modificada del anticuerpo de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo significa un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de enlace de antígeno del mismo proporcionado con modificación química o biológica. La forma químicamente modificada incluye, por ejemplo, una forma que tiene un esqueleto de aminoácido conjugado con una porción química, y una forma que tiene una cadena de carbohidratos ligada en "O" o ligada en "N" químicamente modificada. La forma biológicamente modificada incluye, por ejemplo, una forma que se ha sometido a modificación post-traducciona (por ejemplo, glicosilación ligada en "N" o ligada en "O", procesamiento de una región con terminal amino o carboxilo, desamidación, isomerización de ácido aspártico, u oxidación de metionina), y una forma que contiene un residuo de metionina agregado a la terminación amino por expresión usando células hospederas procarióticas. Tal forma modificada también significa que incluye una forma etiquetada para permitir la detección o aislamiento del anticuerpo o el antígeno de la presente invención, por ejemplo, una forma etiquetada por enzimas, una forma etiquetada fluorescentemente, o una forma etiquetada por afinidad. Tal forma modificada del anticuerpo de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo es útil para la mejora de la estabilidad o la retención sanguínea del anticuerpo original de la presente invención o el fragmento de enlace de antígeno original del mismo, reducción en antigenicidad, detección o aislamiento del anticuerpo o del antígeno, etc.

Ejemplos de la porción química contenida en la forma químicamente modificada pueden incluir polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, y alcohol polivinílico.

Ejemplos de la forma biológicamente modificada pueden incluir una forma modificada por tratamiento enzimático, tratamiento celular, o similares, una forma fusionada con otro péptido, tal como una etiqueta, agregada por recombinación génica, una forma preparada a partir de células hospederas que expresan una enzima modificadora de cadena de azúcar endógena o exógena.

Tal modificación puede hacerse en una posición arbitraria o en una posición deseada en el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo. Alternativamente, modificaciones iguales o dos o más diferentes pueden hacerse en una o dos o más posiciones en ella.

La delección en estas secuencias de cadena pesada o la modificación en las secuencias de cadena ligera o pesada, sin embargo, raramente tienen influencia en la capacidad del anticuerpo para enlazar al antígeno y sus funciones efectoras (activación del complemento, efectos citotóxicos dependientes del anticuerpo, etc.).

De esta manera, la presente invención también abarca un anticuerpo que ha recibido la delección

o la modificación. Ejemplos del mismo pueden incluir una variante de delección derivada de una cadena pesada por la delección de 1 o 2 aminoácido(s) en su terminación carboxilo (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), una forma amidada de la variante de delección que tiene una cadena pesada que carece de dos de los residuos de aminoácido (glicina y lisina) en el terminal carboxi y en su lugar tiene un residuo amidado de prolina en el terminal carboxi (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)), y un anticuerpo modificado que tiene un residuo piroglutamilado de glutamina o ácido glutámico en el terminal amino en su cadena pesada o ligera (publicación internacional No. WO2013/147153) (estos se refieren colectivamente como una "variante de delección"). Sin embargo, la variante de delección en la terminación carboxilo del la cadena ligera o pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no está limitada a los tipos antes descritos con tal de que la variante de delección mantenga la capacidad de enlazar al antígeno y las funciones efectoras. Cuando el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende dos o más cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas), las dos o más cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas) pueden ser cadenas pesadas de algún tipo seleccionado del grupo que consiste en la cadena pesada de longitud completa y las variantes de delección antes descritas, o puede ser una combinación de cadenas pesadas de cualquiera de los dos tipos seleccionados a partir de ello. La relación cuantitativa de cada variante de delección o la relación del número de moléculas del mismo pueden estar influenciadas por el tipo de células mamíferas cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, y condiciones de cultivo. Ejemplos de tal caso pueden incluir la delección de un residuo de aminoácido en el terminal carboxilo cada uno en ambas de las dos cadenas pesadas como los componentes principales del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

El anticuerpo de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo (por ejemplo, contenido en la molécula, la molécula multiespecífica, la molécula biespecífica, etc. de la presente invención), incluso si 1 a varios aminoácido(s) derivados de, por ejemplo, un vector de expresión y/o una secuencia señal, se agregan a la terminación amino y/o la terminación carboxilo (y una porción o la totalidad de la misma se modifica como se describe anteriormente), se incluye en el alcance de la forma modificada del anticuerpo de la presente invención o la forma modificada del fragmento de enlace de antígeno del mismo con tal de que la actividad de enlace a antígeno deseada se mantenga. Una molécula que comprende tal forma modificada del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno se incluye también en el alcance de la molécula de la presente invención.

En la presente invención, el alcance del "anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo" significa también que incluye la "variante de delección" y la "forma modificada" del "anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo", y mezclas con ello. El "anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo" contenido en la molécula, la molécula multiespecífica, la molécula biespecífica, etc. de la presente invención significan también que incluyen la "variante de delección" y la "forma modificada" del "anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo", y mezclas con ellos.

La presente invención también abarca conjugados formados por los anticuerpos antes mencionados ligados con otras moléculas por medio de enlazadores (inmunoconjugados). Ejemplos de tal complejo de anticuerpo-fármaco en el cual se conjuga el anticuerpo con un material o un compuesto

radioactivo (fármaco) que tiene una acción farmacológica puede incluir ADC (conjugado anticuerpo-fármaco) ([Methods Mol Biol. (2013) 1045: 1-27; Nature Biotechnology (2005) 23, p.1137-1146)).

Además, la presente invención también abarca conjugados que comprenden estos anticuerpos conectados a otros polipéptidos funcionales. Ejemplos de tal complejo anticuerpo-péptido pueden incluir un complejo del anticuerpo y un polipéptido con enlace a albúmina (Protein Eng Des Sel. (2012) (2): 81-8).

Estas formas modificadas del anticuerpo, anticuerpos que se han sometido a la modificación de la cadena de azúcares de esta manera reguladas, y conjugados están abarcados por el anticuerpo de la presente invención. Los fragmentos de enlace de antígeno de estas formas modificadas del anticuerpo, anticuerpos que se han sometido a la modificación de la cadena de azúcares de esta manera reguladas, y conjugados están abarcados por el fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo de la presente invención.

3-5. Enlace de anticuerpos al mismo sitio

Un anticuerpo que se enlaza a un sitio sobre el GPRC5D humano enlazado por el anticuerpo proporcionado por la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo también se incluye en el anticuerpo de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo. El anticuerpo que enlaza al mismo sitio sobre el antígeno GPRC5D humano como en el caso de un determinado anticuerpo significa otro anticuerpo que enlaza al mismo sitio sobre la molécula de antígeno como aquel reconocido por el anticuerpo. Si un segundo anticuerpo enlaza a un péptido parcial o a una estructura tridimensional parcial sobre una molécula de antígeno enlazada por un primer anticuerpo, el primero y segundo anticuerpos se determinan como enlace al mismo sitio.

Alternativamente, el primero y segundo anticuerpos se determinan como enlace al mismo sitio al confirmar que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo para enlace al antígeno, es decir, el segundo anticuerpo interfiere con el enlace del primer anticuerpo al antígeno, incluso si la secuencia de péptidos o estructura tridimensional del sitio de enlace específico no está determinada.

Cuando el primero y segundo anticuerpos se enlazan al mismo sitio, el segundo anticuerpo tiene una probabilidad crecientemente alta de que tenga la misma actividad como el primer anticuerpo.

El sitio de enlace del anticuerpo puede determinarse mediante un método bien conocido por aquellos expertos en la técnica, tal como inmunoensayo. Por ejemplo, una serie de péptidos se preparan al escindir apropiadamente la secuencia de aminoácidos del antígeno desde su terminación carboxilo o terminación amino, y la reactividad del anticuerpo a ellas se estudia para determinar aproximadamente un sitio de reconocimiento. Luego, se sintetizan los péptidos más cortos, y la reactividad del anticuerpo a estos péptidos puede estudiarse para determinar con ello el sitio de enlace. Los péptidos del fragmento de antígeno pueden prepararse usando una técnica tal como recombinación génica o síntesis de péptidos.

3-6. Polinucleótido, vector, y célula de la presente invención

La presente invención también proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, o 91) que

codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo, un vector que comprende el polinucleótido, una célula que comprende el polinucleótido o el vector, y una célula que produce el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo, etc. Tal polinucleótido, vector (una forma circular tal como un plásmido, y una forma no circular incluyendo vectores integrados en cromosomas), y célula son útiles en la producción del anticuerpo anti-GPRC5D o fragmento de enlace de antígeno del mismo mencionado posteriormente.

El polinucleótido de la presente invención puede contener una secuencia arbitraria de nucleótidos, además de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-GPRC5D o fragmento de enlace de antígeno del mismo. Por ejemplo, además de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, etc. del Listado de Secuencias) que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un péptido de molécula de transducción de señal de actividad y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una molécula co-estimuladora son también parte del aspecto del polinucleótido de la presente invención. La presente invención también proporciona un inmunocito artificial que tiene actividad de enlace contra células tumorales a través de un receptor de antígeno quimérico (CAR) expresado por la transfección de un inmunocito (por ejemplo, una célula T, una célula NK, o un monocito) con tal polinucleótido (posteriormente, también referida como el inmunocito artificial de la presente invención).

CAR es una proteína quimérica que tiene scFv que comprende cadenas ligeras y pesadas enlazadas en tándem derivadas de un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de superficie sobre células tumorales, y una molécula de transducción de señal de actividad (por ejemplo, CD3 ζ para receptores de células T o un receptor Fc γ para moléculas de inmunoglobulina) en su terminación amino y terminación carboxi, respectivamente, entre las cuales un dominio de articulación extracelular, un dominio de transmembrana, una molécula co-estimuladora que activa inmunocitos, y los similares se conectan. En la célula de la presente invención, el anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de superficie sobre células tumorales es el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención. El inmunocito de la presente invención que expresa CAR reconoce una proteína GPRC5D sobre la superficie tumoral por medio del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención en la forma de scFv aunque la activación del inmunocito mismo se induce por la molécula de transducción de señal de actividad intracelular para atacar células tumorales.

En el caso de usar una célula T como el inmunocito a ser transfectado con el polinucleótido de la presente invención, el receptor de antígeno quimérico (CAR) expresado sobre la superficie celular por la transfección de la célula T con este polinucleótido puede provocar que una célula que expresa GPRC5D y la célula T estén cerca una con la otra para inducir la citotoxicidad mediada por la activación de células T para la célula que expresa GPRC5D, es decir, citotoxicidad por la redirección de la célula T. La

presente invención también proporciona tal célula T que expresa CAR (posteriormente, también referida como la célula T de la presente invención).

En otras palabras, la célula T de la presente invención puede redireccionarse a células tumorales que expresan GPRC5D para inducir citotoxicidad a las células tumorales.

5 La molécula de transducción de señal de actividad se transfecta dentro del inmunocito con objeto de transducir señales desde un inmunocito receptor dentro de la célula. En el caso de usar, por ejemplo, una célula T como el inmunocito, ejemplos de la molécula de transducción de señal de actividad incluyen CD3 ζ , DAP12, y FcR γ .

10 La molécula co-estimuladora se transfecta dentro del inmunocito con objeto de activar más fuertemente el inmunocito. En el caso de usar, por ejemplo, una célula T como el inmunocito, ejemplos de la molécula co-estimuladora incluyen CD2, CD27, CD28, CD49d, CD134, CD152, CD154, ICOS, 4-1BB, y RANKL.

4. Molécula que tiene actividad de enlace a antígeno

15 La molécula de la presente invención comprende el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo.

Además, la molécula de la presente invención puede comprender, por ejemplo, una secuencia señal, una etiqueta para purificación, etc., Gly en el terminal amino, una porción enlazadora de fármaco de ADC, un polipéptido con enlace a albúmina, un polímero tal como PEG, un anticuerpo diferente al anticuerpo anti-GPRC5D, un fragmento de enlace de antígeno del mismo, y una proteína que tiene actividad de enlace a antígeno sin que tenga un esqueleto de inmunoglobulina, el cual se describirá más adelante. Ejemplos del anticuerpo diferente al anticuerpo anti-GPRC5D incluyen un anticuerpo anti-CD3. La molécula de la presente invención incluye una molécula multiespecífica descrita más adelante.

4-1. Molécula multiespecífica

25 La molécula multiespecífica de la presente invención es una molécula que tiene dos o más sitios de enlace de antígenos. Específicamente, la molécula multiespecífica de la presente invención es una molécula capaz de enlace a dos o más epítomos diferentes uno del otro sobre una molécula, o epítomos diferentes uno del otro sobre dos o más moléculas, y comprende una pluralidad de fragmentos de enlace de antígenos diferentes uno del otro. Ejemplos de tal molécula multiespecífica incluyen, pero no se limitan a, moléculas multiespecíficas del tipo IgG y moléculas multiespecíficas que tienen dos o más tipos de regiones variables, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos tales como scFv en tándem, diacuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, y triacuerpos, y fragmentos de anticuerpos ligados por un enlace covalente o un enlace no covalente. La molécula multiespecífica puede contener Fc.

35 La molécula multiespecífica de la presente invención comprende el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo. La molécula multiespecífica de la presente invención comprende el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del mismo y 1 o 2 o más anticuerpo(s) que es diferente del anticuerpo anti-GPRC5D y enlaza a un epítipo ausente en GPRC5D y presente en otro antígeno, o fragmento de enlace de antígeno(s) del anticuerpo(s).

Ejemplos del fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-GPRC5D pueden incluir Fab, F(ab)', Fv, scFv, y sdAb.

La molécula multiespecífica de la presente invención específicamente enlaza a GPRC5D o puede enlazarse además a un objetivo tal como un receptor Fc sobre células efectoras.

5 Ejemplos del anticuerpo diferentes del anticuerpo anti-GPRC5D que puede estar contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención incluyen un anticuerpo anti-CD3.

Como un ejemplo preferido, el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del mismo que puede estar contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención retiene a la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 183 (FIG. 10 206) (GVTFNYYG), la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 238 (FIG. 276) (ITX_{aa}X_{aa}GGRI) (en donde cada uno del primer X_{aa} y el segundo X_{aa} es un residuo de aminoácido natural arbitrario; posteriormente, el primer X_{aa} y el segundo X_{aa} en la CDR2 de cadena pesada son también referidos como X₁ y X₂, respectivamente), y 15 la CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 185 (FIG. 208) (TLDGRDGWVAY).

La región variable de cadena ligera contenida en un anticuerpo anti-CD3 humanizado preferido de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo retiene la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 186 (FIG. 209) (TGNIGSNY), la CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 239 (FIG. 277) (RX_{aa}D) (en donde X_{aa} es un residuo de aminoácido natural arbitrario; posteriormente, X_{aa} en la CDR2 de cadena ligera es también referido como X₃), y la CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 25 188 (FIG. 211) (QSYSSGFI).

En lo antes mencionado la CDR2 de cadena pesada (ITX₁X₂GGRI), preferiblemente, X₁ se selecciona del grupo que consiste en (A, E, G, H, I, L, T, V, R, y S), y X₂ es S; o X₁ es N, y X₂ se selecciona del grupo que consiste en (E, R, F, Y, L, V, I, K, y T).

En lo antes mencionado la CDR2 de cadena ligera (RX₃D), preferiblemente, X₃ se selecciona del 30 grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D).

En lo antes mencionado la CDR2 de cadena pesada (ITX₁X₂GGRI), más preferiblemente, X₁ se selecciona del grupo que consiste en (R y S), y X₂ es S.

En lo antes mencionado la CDR2 de cadena ligera (RX₃D), más preferiblemente X₃ se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D).

35 Ejemplos preferidos del anticuerpo anti-CD3 humanizado o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo los cuales pueden estar comprendidos en una molécula de la presente invención comprenden una región variable de cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido mostrados en SEQ ID NO: 240 (FIG. 278) y una región variable de cadena ligera que comprende los residuos de aminoácido

mostrados en SEQ ID NO: 241 (FIG. 279), SEQ ID NO: 242 (FIG. 280), o SEQ ID NO: 243 (FIG. 281), en donde X_1 en los residuos de aminoácido mostrado en SEQ ID NO: 240 se selecciona del grupo que consiste en (A, E, G, H, I, L, T, V, R, y S), y X_2 es S; o X_1 es N, y X_2 se selecciona del grupo que consiste en (E, R, F, Y, L, V, I, K, y T).

5 Ejemplos más preferidos de anticuerpo anti-CD3 humanizado o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo los cuales pueden estar comprendidos en una molécula de la presente invención comprenden una región variable de cadena pesada que comprende los residuos de aminoácido mostrados en SEQ ID NO: 240 (FIG. 278) y una región variable de cadena ligera que comprende los
10 NO: 243 (FIG. 281), en donde X_1 en los residuos de aminoácido mostrados en SEQ ID NO: 240 se seleccionan del grupo que consiste en (R, S), y X_2 es S; y X_3 se selecciona del grupo que consiste en N, y X_2 se selecciona del grupo que consiste en (Q, A, G, S, N, y D).

Ejemplos específicos del anticuerpo anti-CD3 humanizado preferido de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo incluyen un anticuerpo o un fragmento de enlace de
15 antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 183 (GVTFNYYG),
la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 184
20 (ITNSGGRI), y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 185 (TLDGRDGWVAY), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 186
25 (TGNIGSNY), la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 187 (RDD), y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 188 (QSYSSGFI),
y enlaza a la CD3 humana y a la CD3 de mono cynomolgus. Las posiciones y tramos de estas CDRs del
30 anticuerpo anti-CD3 se determinaron de acuerdo con la definición de IMGT.

El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del mismo contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención que tiene las CDRs antes mencionadas, y sus regiones variables (posteriormente, también referida como el anticuerpo anti-CD3, etc. de la presente invención) se enlazan a un dominio del tipo Ig presente en la región extracelular de la cadena ϵ del complejo de CD3 humana.
35 Adicionalmente, estos también se enlazan a un dominio de tipo Ig presente en la región extracelular de la cadena ϵ de la CD3 del complejo de mono cynomolgus.

Los epítomos presentes en la región extracelular de la cadena ϵ del complejo de CD3 humana enlazado por el anticuerpo anti-CD3, etc. contenido en la molécula multiespecífica de la presente

invención contiene los siguientes aminoácidos:

Ser55, Glu56, Leu58, Trp59, Asn65, Ile66, Ser77, Asp78, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104, y Pro105.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD3, etc. contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención puede mantener el enlace a la CD3 humana por enlace a una región de epítipo que contiene por lo menos 7 aminoácidos seleccionados de estos 13 aminoácidos.

Cuando un anticuerpo está adyacente a estos aminoácidos a una distancia dentro de 4 angstroms, tal anticuerpo puede confirmarse para tener la misma especificidad de epítipo como aquella del anticuerpo anti-CD3, etc. contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención. Por otra parte, entre estos aminoácidos de epítipo, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104, y Pro105 están también residuos de epítipo que interactúan con un anticuerpo anti-CD3 OKT3 o UCHT1 conocido en la técnica (Lars Kjer-Nielsen et al., PNAS (2004); y Kelly L Arnett et al., PNAS (2004)). Sin embargo, OKT3 o UCHT1 enlaza a la CD3 humana, pero no enlaza a la CD3 de mono cynomolgus.

Tal anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo contenido en la molécula multiespecífica de la presente invención puede someterse a varias pruebas sobre eficacia o seguridad usando primates, particularmente, monos cynomolgus, útiles para el desarrollo no clínico (desarrollo preclínico) de productos farmacéuticos, y es de esta manera preferido. También, el anticuerpo, etc. que enlaza a CD3 humana y CD3 de mono cynomolgus tiene actividad citotóxica y es útil, ya sea solo o como la molécula de la presente invención, en el tratamiento o prevención de enfermedades tales como cánceres en monos cynomolgus. La composición farmacéutica se describirá posteriormente.

El anticuerpo anti-CD3 puede ser un anticuerpo de animal no humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. El anticuerpo anti-CD3 es preferiblemente un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

Ejemplos del fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo anti-CD3 incluyen Fab, F(ab)', Fv, scFv, y sdAb.

Ejemplos del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende las CDRs antes descritas incluyen un anticuerpo humanizado o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 240 (FIG. 278), y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 241 (FIG. 279), 242 (FIG. 280), y 243 (FIG. 281). Ejemplos específicos del mismo incluyen un anticuerpo humanizado o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 155, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 156, 158, y 160.

Ejemplos específicos del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo incluyen un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 180, 181, o 182. Ejemplos más específicos del mismo

incluyen un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende los residuos de aminoácido 2 al 243 de SEQ ID NO: 180,

un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende los residuos de aminoácido 2 al 243 de SEQ ID NO: 181, y

- 5 un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende los residuos de aminoácido 2 al 241 de SEQ ID NO: 182.

El anticuerpo anti-CD3 antes mencionado puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano que comprende una región constante de inmunoglobulina humana o Fc. Fc puede ser Fc mutado.

- 10 Ejemplos preferidos de molécula multiespecífica de la presente invención, que comprende anticuerpo anti-GPRC5D o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo y anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo pueden comprender el anticuerpo anti-GPRC5D o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo derivados del 2B1 antes mencionado y comprenden un anticuerpo que se enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende

- 15 • una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 132 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209,

- 20 • una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 130 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213,

- 25 • una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 244 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 244,

- 30 • una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 245 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 241 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 245,

- 35 • una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 246 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada

• una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 254 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 254, o

• una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 2 al 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 255 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 135 al 243 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 255.

La molécula preferida de estos en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado.

La molécula más preferida de estos es donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado.

Ejemplos específicos preferidos de molécula multiespecífica de la presente invención pueden comprender

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 219 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 221 y Fc mutado;

5 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

10 y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 225 y Fc mutado;

15 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

20 el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 227 y Fc mutado;

25 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

30 el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 229 y Fc mutado;

35 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de

antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 231 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 233 y Fc mutado; o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 235 y Fc mutado.

Ejemplos específicos de ejemplos más preferidos de molécula multiespecífica de la presente invención pueden comprender

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 225 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de

antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 227 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 229 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 231 y Fc mutado;

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 233 y Fc mutado; o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 235 y Fc mutado.

Ejemplo alternativo de molécula en donde el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y comprende

i) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 199, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203,

ii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205,

iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

o

iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,

y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende

v) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 133 al 238 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209, o

vi) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 143 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos

representada por los residuos de aminoácido 131 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213.

Ejemplo más preferido de la molécula puede comprender

- 5 iii) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 215, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
- 10 o
- iv) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 237, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 217,
- 15 y
- el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende
- v) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 147 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 133 al 238 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 209, o
- 20
- vi) una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 143 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 131 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213.
- 25

Ejemplo específico de la molécula puede comprender

- 30 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 119 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 203, y
- el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 207 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 238 de la secuencia de aminoácidos representada por
- 35

SEQ ID NO: 209

o

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los
5 residuos de aminoácido 24 al 475 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 201 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 237 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 205, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de
10 aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 25 al 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 211 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 213.

La molécula alternativa puede comprender el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un
15 fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 20 al 142 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 21 al 127 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 72, y Fc mutado, y

20 el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo comprende Fc mutado.

Ejemplo específico de estos puede comprender

el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24
25 al 271 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 223 y Fc mutado, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 266 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 219 y Fc mutado

o

30 el anticuerpo que enlaza a GPRC5D humano o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los residuos de aminoácido 24 al 271 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 223 y Fc mutado, y

el anticuerpo que enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos representada por los residuos de
35 aminoácido 24 al 264 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 221 y Fc mutado.

La molécula de la presente invención también abarca una molécula que comprende una porción de un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de enlace de antígeno del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en un polinucleótido

que hibridiza bajo condiciones severas a una hebra complementaria de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en el anticuerpo anti-CD3 mencionado anteriormente o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus, y una porción de un anticuerpo anti-GPRC5D o un fragmento de enlace de antígeno del mismo que enlaza a GPRC5D humano y preferiblemente además enlaza a GPRC5D de mono cynomolgus.

La molécula de la presente invención también abarca una molécula que comprende una porción de un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de enlace de antígeno del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y/o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera contenido en el anticuerpo anti-CD3 mencionado anteriormente o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus, y una porción de un anticuerpo anti-GPRC5D o un fragmento de enlace de antígeno del mismo que enlaza a GPRC5D humano y preferiblemente además enlaza a GPRC5D de mono cynomolgus.

La molécula de la presente invención también abarca una molécula que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos contenida en el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo por la sustitución, delección, o modificación de 1 a varios aminoácido(s), y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y a GPRC5D humano y preferiblemente además enlaza a GPRC5D de mono cynomolgus. Ejemplos de tal anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo puede incluir una variante de delección derivada de una cadena pesada por la delección de 1 o 2 aminoácidos en su terminación carboxilo (Journal de Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), una forma amidada de la variante de delección que tiene una cadena pesada que carece de dos de los residuos de aminoácido (glicina y lisina) en el terminal carboxi y en su lugar tiene un residuo de prolina amidado en el terminal carboxi (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)), y un anticuerpo modificado que tiene un residuo de glutamina o ácido glutámico piroglutamilado en el terminal amino en su cadena pesada o ligera (Publicación Internacional No. WO2013/147153) (estos se refieren colectivamente como una “variante de delección”). Sin embargo, la variante de delección en la terminación carboxilo de la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo contenido en la molécula de la presente invención no se limita a los tipos descritos anteriormente en la medida en que la variante de delección mantenga la capacidad de enlace al antígeno y las funciones efectoras. Cuando el anticuerpo contenido en la molécula de la presente invención comprende dos o más cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas, las dos o más cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas) pueden ser cadenas pesadas de cualquiera de un tipo seleccionada del grupo que consiste en la cadena pesada de longitud completa y las variantes de delección descritas anteriormente, o

pueden ser una combinación de cadenas pesadas de cualquiera de dos o más tipos seleccionadas de las mismas. La relación cuantitativa de cada variante de delección o la relación del número de moléculas del mismo puede estar influenciada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen la molécula de la presente invención, y condiciones de cultivo. Ejemplos de tal caso pueden incluir la delección de un residuo de aminoácido en el carboxil-terminal cada uno en ambas de las dos cadenas pesadas como componentes principales de la molécula de la presente invención.

4-2. Molécula biespecífica de la presente invención

Los ejemplos preferidos de la molécula multiespecífica de la presente invención pueden incluir moléculas biespecíficas. El término “biespecífica” significa la capacidad de enlace a dos epítopos diferentes uno del otro en una molécula, o epítopos diferentes uno del otro en dos o más moléculas. Un anticuerpo o un fragmento de enlace de antígeno que tiene tal capacidad biespecífica se abarca por la presente invención.

La molécula biespecífica de la presente invención enlaza a GPRC5D y enlaza a un epítipo que es ausente en GPRC5D y presente en otro antígeno. Más específicamente, tal molécula biespecífica (i) enlaza a un epítipo en GPRC5D (epítipo 1) y (ii) enlaza a un epítipo diferente del epítipo 1 en GPRC5D (epítipo 2), o enlaza a un epítipo en un antígeno diferente a GPRC5D (epítipo 3).

Por ejemplo, en una molécula biespecífica tipo scFv en tándem tipificada por BiTE, un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena pesada de un primer anticuerpo y un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena ligera del primer anticuerpo se enlazan ya sea por medio de un enlazador o directamente sin un enlazador para formar un primer polipéptido. También, un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena pesada de un segundo anticuerpo y un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena ligera del segundo anticuerpo se enlazan ya sea por medio de un enlazador o directamente sin un enlazador para formar un segundo polipéptido. El primer polipéptido y el segundo polipéptido se enlazan ya sea por medio de un enlazador o directamente sin un enlazador. Alternativamente, el primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden enlazarse por medio de una molécula adicional.

En una molécula biespecífica tipo diacuerpo, un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena pesada de un primer anticuerpo y un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena ligera de un segundo anticuerpo se enlazan ya sea por medio de un enlazador o directamente sin un enlazador. También, un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena ligera del primer anticuerpo y un sitio de enlace de antígeno en la región variable de cadena pesada del segundo anticuerpo se enlazan ya sea por medio de un enlazador o directamente sin un enlazador. También, una molécula biespecífica puede prepararse por la dimerización adicional de moléculas biespecíficas tipo diacuerpo. Además, la molécula biespecífica tipo diacuerpo puede enlazarse a una cadena sencilla o ambas cadenas de Fc por medio de un enlazador (molécula biespecífica tipo diacuerpo-Fc).

En una molécula biespecífica tipo scFv doble, se enlazan dos enlaces scFvs a diferentes epítopos a dos cadenas de Fc dimérico, respectivamente, ya sea por medio de enlazadores o directamente sin enlazadores. Alternativamente, dos tipos de enlaces scFvs a diferentes epítopos se

enlazan a CH y CL, respectivamente, por medio de enlazadores y además se enlazan a dos cadenas de Fc dimérico, respectivamente, por medio de enlazadores. La molécula biespecífica tipo scFv doble se describe como Molécula biespecífica tipo Doble o tipo Doble.

5 En una molécula biespecífica tipo IgG, dos enlaces Fabs a diferentes epítomos se enlazan a dos cadenas de Fc dimérico, respectivamente, ya sea por medio de enlazadores o directamente sin enlazadores. La molécula biespecífica tipo IgG se describe como Molécula biespecífica tipo anticuerpo de tamaño completo (FSA) o tipo FSA.

10 Alternativamente, la molécula biespecífica de la presente invención puede ser una molécula biespecífica en la que Fab de un primer anticuerpo y scFv de un segundo anticuerpo están unidos a dos cadenas de Fc dimérico, respectivamente, ya sea a través de conectores o directamente sin conectores. Dicho anticuerpo biespecífico se describe como un anticuerpo biespecífico de tipo híbrido de tipo híbrido.

El scFv y el Fab contenidos en la molécula biespecífica de la presente invención son preferiblemente scFv y Fab de un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, y el Fc es preferiblemente Fc de un anticuerpo humano.

15 El enlazador también incluye un polipéptido de cadena sencilla o un oligopéptido de cadena sencilla, o productos sintéticos tales como PEG, nucleótidos, cadenas de azúcar y compuestos. Además, cualquier enlazador conocido en la técnica puede usarse sin limitaciones particulares siempre que el enlazador enlace dos polipéptidos.

20 La longitud del enlazador es de 5 a 30 aminoácidos para, por ejemplo, un enlazador péptido. Cuando la molécula biespecífica contiene una pluralidad de enlazadores, todos los enlazadores péptidos usados pueden tener la misma longitud o los enlazadores péptidos usados pueden tener diferentes longitudes.

Los ejemplos de del enlazador péptido incluyen una repetición (Gly·Gly·Gly·Gly·Ser). Pueden agregarse 1 a varios de los residuos de aminoácido diferentes a Gly y Ser a esto.

25 Los ejemplos del anticuerpo que enlaza a un epítomo en un antígeno diferente a GPRC5D (epítomo 3) o fragmento de enlace de antígeno del mismo contenido en la molécula biespecífica de la presente invención puede incluir el anticuerpo anti-CD3 anteriormente mencionado o fragmento de enlace de antígeno del mismo.

30 Los ejemplos de la molécula biespecífica de la presente invención pueden incluir una molécula en la cual el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo se enlaza con el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo por medio de un enlazador o sin un enlazador. Los ejemplos preferidos de tal molécula pueden incluir una molécula en la cual el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo y el anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención o fragmento de enlace de antígeno del anticuerpo, 35 cada uno de los cuales es scFv, se unen uno con el otro por medio de un enlazador o sin un enlazador.

Los ejemplos preferidos específicos de tal molécula pueden incluir a molécula que tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NOS: 171 a 179, y enlaza a la CD3 humana y la CD3 de mono cynomolgus y a GPRC5D humano y preferiblemente además enlaza a

GPRC5D de mono cynomolgus.

5. Producción de anticuerpo y molécula

5-1. Método usando hibridoma

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención puede obtenerse mediante el uso de un método de rutina que implica inmunizar un animal con GPRC5D o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de GPRC5D y recolectar y purificar el anticuerpo producido *in vivo*. Según un método conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, NY (1980)), las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra GPRC5D se fusionan con células de mieloma para establecer hibridomas, a partir de los cuales también se pueden obtener anticuerpos monoclonales. Ejemplos específicos de dicho método se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional No. WO09 /48072 (publicada el 16 de abril de 2009).

La especie de organismo del antígeno GPRC5D no se limita a un humano, y el animal también puede inmunizarse con GPRC5D derivado de un animal no humano como un ratón o una rata. En este caso, el anticuerpo obtenido que se une a GPRC5D no humano puede analizarse por su reactividad cruzada con GPRC5D humano para seleccionar de ese modo un anticuerpo aplicable a enfermedades humanas.

El anticuerpo anti-CD3 que puede estar contenido en la molécula de la presente invención también se puede obtener mediante el uso de un método de rutina que implica inmunizar a un animal con CD3 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de CD3 y recoger y purificar el anticuerpo producido *in vivo*. De acuerdo con un método conocido en la técnica, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra CD3 se fusionan con células de mieloma para establecer hibridomas, a partir de los cuales también se pueden obtener anticuerpos monoclonales.

La especie de organismo del antígeno CD3 no se limita a un humano, y el animal también puede inmunizarse con CD3 derivado de un animal no humano como un ratón o una rata. El anticuerpo obtenido que se une a CD3 no humano puede analizarse para determinar su reactividad cruzada con CD3 humano para seleccionar de ese modo un anticuerpo aplicable a enfermedades humanas.

5-2. Método de inmunización celular

Las células que expresan el antígeno nativo, las células que expresan el antígeno recombinante o su fragmento, o similares, pueden usarse como inmunógenos para preparar de ese modo un anticuerpo mediante el método de hibridoma descrito anteriormente.

Los ejemplos de las células que expresan el GPRC5D nativo pueden incluir células plasmáticas humanas, células cultivadas primarias derivadas de pacientes con mieloma múltiple humano y líneas celulares cultivadas derivadas de pacientes con mieloma múltiple humano. Los ejemplos de las células que expresan el GD3 nativo pueden incluir células de timo humano y linfocitos T.

Dichas células se usan en una cantidad de 1×10^5 a 1×10^9 células, preferiblemente 1×10^6 a 1×10^8 células, más preferiblemente 0.5 a 2×10^7 células, incluso más preferiblemente 1×10^7 células, por inyección de inmunización. El número de células utilizadas para la inmunización se puede cambiar de

acuerdo con el nivel de expresión del antígeno. Los inmunógenos se administran generalmente por vía intraperitoneal y pueden administrarse por vía intradérmica o similar.

5-3. Método de inmunización de ADN

El anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención y el anticuerpo anti-CD3 que pueden estar contenidos en la molécula de la presente invención (en adelante, estos anticuerpos también se denominan colectivamente como el anticuerpo de la presente invención) también pueden obtenerse mediante el uso de un método de inmunización de ADN. Este método implica transfectar un individuo animal (por ejemplo, ratón o rata) con un plásmido de expresión de antígeno y expresar el antígeno en el individuo para inducir de ese modo inmunidad contra el antígeno. Los ejemplos del enfoque de transfección incluyen un método para inyectar directamente el plásmido en el músculo, un método para inyectar un reactivo de transfección como un liposoma o polietilenglicol en la vena, un método que utiliza un vector viral, un método para inyectar partículas de oro unidas con el plásmido usando una pistola de genes y un método hidrodinámico de inyectar rápidamente una solución de plásmido en una gran cantidad a la vena.

Los ejemplos actuales del anticuerpo humano anti-GPRC5D de rata de esta manera establecidos pueden incluir 2A4, 2B1, y 7B4. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 5 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 12 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2B1 se muestra en SEQ ID NO: 7 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2B1 se muestra en SEQ ID NO: 14 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7B4 se muestra en SEQ ID NO: 9 del Listado de Secuencias. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7B4 se muestra en SEQ ID NO: 16 del Listado de Secuencias.

5-4. Diseño del anticuerpo humanizado

Los ejemplos del anticuerpo humanizado pueden incluir, pero no se limitan a, un anticuerpo derivado de humanos que tiene CDR reemplazadas solo con las CDR de un anticuerpo animal no humano (véase Nature (1986), 321, p. 522-525), un anticuerpo humano injertado con las secuencias de CDR y con algunos residuos de aminoácidos de regiones marco mediante injerto de CDR (véanse WO90/07861 y US6972323), y un anticuerpo que tiene aminoácidos de anticuerpo humano reemplazados por uno o dos o más aminoácidos derivados de anticuerpos de animales no humanos en cualquiera de estos anticuerpos humanizados.

5-5. Diseño de anticuerpos humanos

El anticuerpo humano significa un anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado del humano. El anticuerpo humano puede obtenerse mediante un método que usa ratones que producen anticuerpos humanos que llevan fragmentos de ADN genómico humano que comprenden genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et. al., Nuc. Acids Res. (1998) 26, 3447-3448;

Yoshida, H. et. al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol.10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds., Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, 722- 727).

Específicamente, dichos animales que producen de anticuerpos humanos se pueden preparar al alterar los loci de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena de mamíferos no humanos y, en su lugar, introducir en ellos loci de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana a través de vectores de cromosoma artificial de levadura (YAC) o similares. Alternativamente, las células eucariotas pueden transformarse con ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de dicho anticuerpo humano, preferiblemente con vectores que comprenden los ADNc, mediante una técnica de recombinación génica. Las células transformadas que producen un anticuerpo monoclonal humano recombinante pueden cultivarse. Este anticuerpo se puede obtener del sobrenadante de cultivo.

En este contexto, por ejemplo, las células eucariotas, preferiblemente células de mamífero tales como las células HEK293F o las células CHO, se pueden usar como hospedadores.

También, también se conoce un método para obtener un anticuerpo humano derivado de la presentación en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede usar un método de visualización de fagos, que implica permitir que las regiones variables de un anticuerpo humano se expresen como scFv en la superficie del fago y seleccionar una unión del fago al antígeno. El fago seleccionado en función de su capacidad para unirse al antígeno puede someterse a análisis de genes para determinar de ese modo las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo humano que se une al antígeno. Si se determina la secuencia de ADN de scFv que se une al antígeno, se puede preparar un vector de expresión que tenga esta secuencia e introducirlo en hospedadores apropiados para permitirles expresar el anticuerpo humano (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, *Annu. Rev. Immunol* (1994) 12, 433-455).

El método para construir la biblioteca de fagos de anticuerpos humanos es bien conocido. Los genes de regiones variables de anticuerpos humanos se amplifican usando ADNc recogidos de sangre, bazo o ganglios linfáticos humanos como plantillas y cebadores con referencia a, por ejemplo, *J Biol Chem*, 274 (26), 18218-30, (1999) o *Methods Mol Biol*, 178, 59-71, (2002). Los genes de la región variable amplificada pueden usarse para preparar scFv con referencia a *J Immunol Methods*, 201 (1), 35-55 (1997).

5-6. Producción de fragmento de anticuerpo enlazado al antígeno

El fragmento enlazado al antígeno del anticuerpo puede producirse modificando el anticuerpo mediante un método de ingeniería genética, seguido de la expresión en células cultivadas apropiadas.

El método para preparar, por ejemplo, scFv, como el fragmento enlazado al antígeno del anticuerpo es bien conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes E.U.A Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513 y 5,455,030). En este scFv, una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera están enlazadas a través de un enlazador que evita que formen un

conjugado, preferiblemente un enlazador de polipéptido (Huston, J.S. et al., PNAS (1988), 85, 5879-5883). La región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera en scFv pueden derivarse del mismo anticuerpo o pueden derivarse de diferentes anticuerpos.

5 Por ejemplo, un péptido de cadena sencilla arbitrario que consiste en 5 a 30 residuos se usa como el enlazador de polipéptido que enlaza estas regiones variables.

Con objeto de obtener ADN que codifica scFv, de las secuencias de ADN que codifican la región variable de cadena pesada o cadena pesada del anticuerpo y ADN que codifica la región variable de cadena ligera o cadena ligera del mismo, cada porción de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o deseada se usa como plantilla y se amplifica por PCR usando un par de cebadores que
10 flanquean ambos extremos de la plantilla. Posteriormente, el ADN que codifica la porción enlazadora del polipéptido se amplifica aún más en combinación con un par de cebadores que flanquean ambos extremos del ADN para que el fragmento obtenido pueda unirse en sus extremos a los ADN de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Alternativamente, el ADN que codifica la región scFv completa puede obtenerse por síntesis pura.

15 El ADN que codifica scFv puede usarse para preparar de ese modo, de acuerdo con un método de rutina, un vector de expresión que contiene el ADN y las células hospederas transformadas con el vector de expresión. Además, las células hospederas pueden cultivarse y el scFv puede recuperarse de los cultivos de acuerdo con un método de rutina.

También con objeto de obtener cualquier otro fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, se
20 obtiene un gen que codifica un fragmento de enlace al antígeno de acuerdo con el método descrito anteriormente y se introduce en las células. El fragmento de interés de enlace a antígeno puede recuperarse de cultivos de las células.

El anticuerpo de la presente invención se puede multimerizar para mejorar de ese modo su afinidad por el antígeno. En este caso, los anticuerpos del mismo tipo pueden ser multimerizados, o una
25 pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítopos, respectivamente, del mismo antígeno pueden ser multimerizados. Los ejemplos de métodos para multimerizar estos anticuerpos pueden incluir la unión de dos scFv a un dominio IgG CH3, la unión de los mismos a estreptavidina y la introducción de un motivo hélice-giro-hélice.

5-7. Recombinación génica

30 Con objeto de preparar el anticuerpo de la presente invención, un polinucleótido (nucleótido de cadena pesada) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de su cadena pesada y un polinucleótido (nucleótido de cadena ligera) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de su cadena ligera, o un vector que tiene un inserto del nucleótido de la cadena pesada y un vector que tiene un inserto del nucleótido de la cadena
35 ligera se introducen en las células hospederas, y luego las células se cultivan, y el anticuerpo puede recuperarse de los cultivos. El nucleótido de cadena pesada y el nucleótido de cadena ligera pueden insertarse en un vector.

Las células procariotas o eucariotas pueden usarse como células hospederas. En el caso de

usar células eucariotas hospederas, pueden usarse células animales, células vegetales o microbios eucariotas.

Los ejemplos de las células animales pueden incluir células derivadas de mamíferos, es decir, células de riñón embrionario humano células HEK293F (Subedi GP et al., J Vis Exp. (2015) 106), células COS derivadas de riñón de mono (Gluzman, Y. Cell (1981), 23, 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos de ratón NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC CCL-61), líneas deficientes en dihidrofolato reductasa (CHOdhfr-; Urlaub, G. and Chasin, L.A. PNAS (1980), 77, 4126-4220), células derivadas de aves como pollos y células derivadas de insectos.

También, las células modificadas para mejorar las actividades biológicas de los anticuerpos mediante la modificación de las estructuras de la cadena de azúcar se pueden usar como hospederas. Por ejemplo, las células CHO modificadas de manera tal que la proporción de cadenas de azúcar con fucosa no unida con N-acetilglucosamina en sus extremos reductores es del 20% o más entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo que se unen a la región Fc del anticuerpo, pueden usarse para preparar un anticuerpo que tiene actividad ADCC o actividad CDC mejorada (Publicación Internacional No. WO02/31140).

Los ejemplos de los microbios eucariotas pueden incluir levaduras. Los ejemplos de las células procariotas pueden incluir *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Un péptido señal para la secreción del anticuerpo de la presente invención (anticuerpo monoclonal derivado de cada animal, anticuerpo de rata, anticuerpo de ratón, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, etc.) no se limita a la señal secretora de un anticuerpo de la misma especie, el mismo tipo y el mismo subtipo que el anticuerpo de la presente invención o la señal secretora del anticuerpo de la presente invención en sí. Se puede seleccionar y usar cualquier señal secretora de un anticuerpo de diferente tipo o subtipo del mismo o cualquier señal secretora de una proteína derivada de una especie eucariota diferente del mismo o una especie procariota. El péptido señal generalmente no está contenido en las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las cadenas ligeras maduras o cadenas pesadas maduras. Un anticuerpo secretado, etc., que contiene el péptido señal también está incluido en el anticuerpo, etc., de la presente invención o la molécula de la presente invención.

El anticuerpo obtenido, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo y la molécula pueden purificarse hasta que sean homogéneos para no contener otras proteínas. Los métodos habituales de separación y purificación de proteínas pueden usarse para la separación y purificación del anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo y la molécula.

El anticuerpo se puede separar y purificar seleccionado apropiadamente o combinado enfoques, por ejemplo, columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, y/o enfoque isoeléctrico, aunque el método de separación y purificación es no limitado a los mismos.

El método de separación y purificación se puede realizar preferiblemente, por ejemplo, preparando un vector de expresión usando una secuencia de ADN que codifica una etiqueta His o una

etiqueta FLAG añadida al terminal carboxilo de una región variable de anticuerpo, transformando células con este vector, y luego cultivando el células para expresar el anticuerpo y el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, y extraer el sobrenadante del cultivo después de la finalización del cultivo, seguido de purificación usando cromatografía de afinidad de metal (por ejemplo, Ni o Co), columnas de anticuerpos con etiqueta anti-FLAG, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, o similares.

El anticuerpo expresado y el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo que contiene una secuencia de aminoácidos de una etiqueta tal como una etiqueta His o una etiqueta FLAG también está abarcado por el anticuerpo de la presente invención o el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo o la molécula de la presente invención.

5-8. Producción de anticuerpos policlonales.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal. El anticuerpo policlonal se puede recuperar de cultivos de células productoras de anticuerpos diferentes de cultivo mixto (WO2004/061104). Alternativamente, los anticuerpos preparados por separado pueden mezclarse. El antisuero, que es un aspecto del anticuerpo policlonal, puede prepararse inmunizando animales con un antígeno deseado y recuperando suero de los animales de acuerdo con un método estándar.

5-9. Producción de inmunocitos artificiales con especificidad de unión para células tumorales.

Se puede producir un inmunocito artificial provisto de especificidad de unión para células tumorales impartiendo especificidad de antígeno a un inmunocito mediante transfección con, por ejemplo, el gen del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención. Los ejemplos de inmunocitos incluyen células T, células NK y monocitos.

El caso del uso de una célula T como inmunocito se describirá como un ejemplo. La célula T puede inducirse mediante el cultivo de células mononucleares recuperadas de sangre periférica humana mediante un método tal como un método centrífugo de gravedad específica, en un medio en presencia de un anticuerpo anti-CD3, IL-2, IL-12 o más, un anticuerpo anti-IL-4 o IFN- γ .

A continuación, esta célula T se transfecta con un gen del receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el gen del anticuerpo anti-GPRC5D de la presente invención como componente. El gen CAR está típicamente constituido por un gen de un anticuerpo que reconoce un antígeno de superficie en las células tumorales (en la presente invención, el anticuerpo anti-GPRC5D) y un gen que codifica una molécula coestimuladora necesaria para la activación de las células T (por ejemplo, co-estimuladores tales como la cadena ζ del receptor de células T y CD28). El gen CAR que comprende el gen del anticuerpo anti-GPRC5D puede transfectarse a la célula T usando diversos vectores virales. Los ejemplos de dicho vector incluyen vectores de lentivirus, vectores de retrovirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de virus Sendai y liposomas. Se puede preparar un virus recombinante a partir del vector viral que tiene un inserto del gen del anticuerpo anti-GPRC5D y se transfecta a la célula T activada de forma no específica al antígeno mencionada anteriormente. La célula T así transfectada con el gen puede cultivarse para obtener una célula T provista de especificidad para células tumorales.

Si la célula T de la presente invención capaz de inducir citotoxicidad por redireccionamiento,

obtenida por el método de la presente invención tiene la especificidad de antígeno así impartida a la misma, puede confirmarse cocultivando la célula T con células inactivadas obtenidas por el tratamiento con mitomicina C de células tumorales positivas al antígeno que se sabe que expresan GPRC5D y luego miden la cantidad de IFN- γ o IL-2 en el sobrenadante del cultivo.

5 5-10. Producción de molécula multiespecífica y molécula biespecífica.

Los ejemplos del método para preparar la molécula multiespecífica y la molécula biespecífica de la presente invención incluyen un método que implica la introducción de plásmidos de expresión en las células hospederas, seguido de la expresión transitoria, un método que consiste en introducir plásmidos en las células hospederas y luego seleccionar una línea de célula de expresión estable por selección de fármaco, seguido de expresión constitutiva, y un método que implica preparar anticuerpos respectivos o fragmentos de unión a antígeno mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, y luego unir químicamente estos anticuerpos o fragmentos usando un enlazador de péptido sintético.

En cuanto al anticuerpo de cadena sencilla (scFv), los ejemplos del método de preparación incluyen un método que implica unir dos scFv a través de un enlazador peptídico (scFv en tándem), un método que implica intercambiar los dominios respectivos de dos anticuerpos que difieren en especificidad, y formar un dímero por un enlace no covalente (diacuerpo), un método que implica intercambiar los dominios respectivos de dos anticuerpos que difieren en especificidad, y formar una cadena sencilla (diacuerpo de cadena sencilla), y un método que implica preparar diacuerpos de cadena sencilla y luego formar un dímero mediante un enlace no covalente (TandAb, US7129330).

La presente invención también proporciona un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, o una forma modificada del antígeno, etc., un vector recombinante que tiene un inserto del gen, una célula transfectada con el gen o vector, e incluso una célula que produce el anticuerpo de la presente invención.

6. Composición farmacéutica

La presente invención proporciona el anticuerpo anti-GPRC5D o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el polinucleótido, el vector, la célula y el inmunocito artificial de la presente invención, y/o una composición farmacéutica que comprende la molécula que comprende al menos uno de ellos, como un activo ingrediente (en adelante, también denominado composición farmacéutica de la presente invención).

La composición farmacéutica de la presente invención es útil en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades relacionadas con señales GPRC5D anormales o aumentadas debido a la sobreexpresión de GPRC5D o su ligando o mutaciones de GPRC5D o amplificación génica (en adelante, estas enfermedades se denominan “enfermedades relacionadas con GPRC5D”), en particular, varios tipos de cáncer.

Los ejemplos de causas del inicio o exacerbación de tales cánceres a tratar o prevenir pueden incluir una alta expresión de GPRC5D, polimorfismo de nucleótido único (SNP) en un intrón del gen GPRC5D, mutaciones sin sentido que activan constitutivamente GPRC5D y la amplificación o sobreexpresión de Gen GPRC5D.

También, la molécula de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir citotoxicidad para las células que expresan GPRC5D mediante la redirección de inmunocitos tales como las células T a las células. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para inducir citotoxicidad a las células que expresan GPRC5D mediante la redirección de inmunocitos tales como las células T a las células, que comprende la etapa de administrar la molécula de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención.

Los ejemplos de los tipos de cáncer a tratar o prevenir con la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir cánceres que expresan la proteína GPRC5D, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer ovárico, cáncer pulmonar (por ejemplo, cáncer pulmonar de célula no pequeña), cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cérvico-uterino, cáncer sanguíneo, linfoma, y melanoma maligno. Los ejemplos preferidos de los mismos pueden incluir mieloma múltiple que expresa la proteína GPRC5D.

El tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con GPRC5D incluye, entre otros, la prevención del inicio de la enfermedad en un individuo que expresa la proteína GPRC5D, la supresión o inhibición de la exacerbación o progresión de la misma, el alivio de una o dos o más síntomas exhibidos por un individuo afectado con la enfermedad, la supresión o remisión de la exacerbación o progresión de la misma, el tratamiento o prevención de una enfermedad secundaria en un individuo afectado con la enfermedad, etc.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo anti-GPRC5D o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o una molécula que comprende al menos uno de ellos, como ingrediente activo y además contiene un producto farmacéuticamente aceptable, diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservador y/o aditivo.

El término “cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva” significa una cantidad que ejerce efectos terapéuticos o profilácticos sobre una enfermedad particular por medio de una forma de dosificación particular y vía de administración, y se usa indistintamente con una “cantidad farmacológicamente efectiva”.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender materiales para cambiar, mantener o retener el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la tonicidad, la esterilidad o la estabilidad, solubilidad, liberación sostenida, capacidad de absorción, permeabilidad, forma de dosificación, resistencia, propiedades, forma, etc., de la composición o el anticuerpo comprendido en la misma (de aquí en adelante, denominados “materiales farmacéuticos”). Los materiales farmacéuticos no están particularmente limitados siempre que los materiales sean farmacológicamente aceptables. Por ejemplo, la toxicidad nula o baja es una propiedad que poseen preferiblemente estos materiales farmacéuticos.

Los ejemplos de los materiales farmacéuticos pueden incluir, entre otros, los siguientes: aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, histidina, arginina y lisina; agentes

antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio y bisulfito de sodio; soluciones amortiguadoras tales como soluciones amortiguadoras de fosfato, citrato o borato, bicarbonato de sodio y soluciones de Tris- HCl; rellenos tales como manitol y glicina; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); agentes formadores de complejo tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; agentes de carga tales como glucosa, manosa y dextrina; otros hidrocarburos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa y dextrina; agentes colorantes; correctores; diluyentes emulsionantes; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina; polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal; antisépticos tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; solventes tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; tensoactivos tales como PEG, éster de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20 y polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina y colesterol; potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; potenciadores de la elasticidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol y sorbitol; agentes de transporte; diluyentes excipientes y/o aditivos farmacéuticos.

La cantidad de estos materiales farmacéuticos añadidos es de 0.001 a 1000 veces, preferiblemente de 0.01 a 100 veces, más preferiblemente de 0.1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-GPRC5D o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la molécula que comprende al menos uno de ellos.

Un inmunoliposoma que comprende el anticuerpo anti-GPRC5D o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la molécula que comprende al menos uno de ellos, encapsulada en un liposoma, o una composición farmacéutica que comprende una forma de anticuerpo modificada que comprende el anticuerpo conjugado con un liposoma (Patente E.U.A. No. 6214388, etc.) también se incluye en la composición farmacéutica de la presente invención.

Los excipientes o vehículos no están particularmente limitados siempre que sean materiales líquidos o sólidos que se usan generalmente en agua inyectable, solución salina, fluidos cerebroespinales artificiales y otras preparaciones para administración oral o parenteral. Los ejemplos de solución salina pueden incluir solución salina neutra y solución salina que contiene albúmina sérica.

Los ejemplos de soluciones amortiguadoras pueden incluir una solución amortiguadora Tris ajustada para llevar el pH final de la composición farmacéutica a 7.0 a 8.5, una solución amortiguadora de acetato ajustada para llevar el pH final de la misma a 4.0 a 5.5, una solución amortiguadora de citrato ajustada para llevar el pH final de la misma a 5.0 a 8.0, y una solución amortiguadora de histidina ajustada para llevar el pH final de la misma a 5.0 a 8.0.

La composición farmacéutica de la presente invención es un sólido, un líquido, una suspensión o similares. Otro ejemplo de la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir preparaciones liofilizadas. Las preparaciones liofilizadas pueden formarse usando un excipiente tal como sacarosa.

La ruta de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser

cualquiera de administración enteral, administración local y administración parenteral. Ejemplos de los mismos pueden incluir administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intradérmica, administración hipodérmica, administración intraperitoneal, administración transdérmica, administración intraósea y administración intraarticular.

5 La composición de tal composición farmacéutica se puede determinar de acuerdo con el método de administración, la afinidad de unión del anticuerpo por la proteína GPRC5D, etc.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada siempre que la dosis sea una cantidad farmacológicamente efectiva. La dosis puede determinarse adecuadamente de acuerdo con la especie de un individuo, el tipo de enfermedad, síntomas, sexo, edad, condiciones
10 preexistentes, la afinidad de unión del anticuerpo por la proteína GPRC5D o su actividad biológica, y otros factores. Por lo general, se puede administrar una dosis de 0.01 a 1000 mg/kg, preferiblemente de 0.1 a 100 mg/kg, una vez al día a cada 180 días o dos veces o tres o más veces al día.

Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica pueden incluir inyecciones (incluyendo preparaciones y gotas liofilizadas), supositorios, preparaciones de absorción transnasal, preparaciones de
15 absorción transdérmica, formulaciones sublinguales, cápsulas, comprimidos, pomadas, gránulos, aerosoles, píldoras, polvos, suspensiones, emulsiones, gotas para los ojos y formulaciones de implantes biológicos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse simultáneamente o por separado de un fármaco adicional. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención
20 puede administrarse después de la administración del fármaco adicional, o el fármaco adicional puede administrarse después de la administración de la composición farmacéutica. Alternativamente, la composición farmacéutica y el fármaco adicional pueden administrarse simultáneamente. Los ejemplos del fármaco adicional pueden incluir diversos agentes anticancerígenos tales como quimioterapéuticos y radioterapéuticos. Estos casos se denominan colectivamente el “uso combinado con un fármaco
25 adicional” del anticuerpo de la presente invención. También se incluye en la presente invención una composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo de la composición farmacéutica de la presente invención, así como un fármaco adicional.

La presente invención proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con GPRC5D tales como cáncer, el uso del anticuerpo de la presente invención para preparar una
30 composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de las enfermedades, y el uso del anticuerpo de la presente invención para tratar o previniendo las enfermedades. La presente invención también abarca un kit para tratamiento o prevención que comprende el anticuerpo de la presente invención.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describirá de manera adicional específicamente
35 con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a ellos.

Los procedimientos relacionados con la manipulación de genes en los Ejemplos a continuación se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o los métodos descritos en otros manuales

experimentales utilizados por los expertos en la materia, o usando reactivos o kits disponibles comercialmente de acuerdo con los manuales de instrucciones, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1. Preparación del anticuerpo GPRC5D anti-humano de rata

1)-1 Inmunización usando el vector de expresión GPRC5D humano

5 1)-1-1 Construcción del vector de expresión GPRC5D humano (ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D)

El ADNpc3.1-DEST producido por ingeniería como un vector destino se preparó a partir ADNpc3.1 (+) utilizando un Sistema de Conversión de Vector de Puerta de Acceso (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se clonó un ADNc que codifica la proteína GPRC5D humana (NP_061124.1) en el vector ADNpc3.1-DEST utilizando la mezcla de enzima clonasa LR de Puerta de Acceso (Life Technologies Corp.) para construir un vector de expresión de GPRC5D humano ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D. Para la
10 preparación a gran escala del vector de expresión GPRC5D humano, se usó el kit Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen NV).

1)-1-2 inmunización de ratas

Para la inmunización, se usaron ratas hembra WKY/lzm (Japan SLC, Inc.). Primero, ambos
15 muslos inferiores de cada rata se trataron previamente con hialuronidasa (Sigma-Aldrich Corp.). Luego, el ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D se inyectó por vía intramuscular en estos sitios. Posteriormente, la electroporación *in vivo* de estos sitios se llevó a cabo utilizando ECM830 (BTX) y un electrodo de aguja. La misma electroporación *in vivo* como anteriormente se repitió una vez por aproximadamente dos semanas. Luego, se recogió el ganglio linfático o el bazo de la rata y se usó en la preparación del
20 hibridoma.

1)-2 Preparación de hibridoma

Las células de los ganglios linfáticos o las células del bazo se fusionaron eléctricamente con células de mieloma de ratón SP2/0-ag14 (ATCC, No. CRL-1 581) usando la Unidad de fusión celular LF301 (BEX Co., Ltd.). Las células fusionadas se diluyeron con Medio ClonaCell-HY Selection D
25 (StemCell Technologies Inc.) y se cultivaron. Se recuperaron colonias de hibridoma que aparecían para de ese modo preparar hibridomas monoclonales. Cada colonia de hibridoma así recuperada se cultivó usando Medio ClonaCell-HY Selection E (StemCell Technologies Inc.), y el sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido se usó para seleccionar un hibridoma productor de anticuerpos GPRC5D anti-humano.

30 1)-3 Seleccionado de anticuerpos por Cell-ELISA

1)-3-1 Seleccionado primario por Cell-ELISA

Se ajustaron células de línea celular HEK293α (células HEK293 transfectadas de forma estable con la integrina αv y vectores de expresión β3 de integrina) a 5×10^5 células/mL en un medio DMEM que contiene FBS al 10%. Se transfectó ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D o un control ADNpc3.1-DEST a los
35 mismos de acuerdo con los procedimientos de transfección usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las células resultantes se dispensaron en una cantidad de 100 µL/pocillo a una placa de 96 pocillos (Corning Inc.) y se cultivaron durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contiene FBS al 10%. Las células transfectadas obtenidas se usaron en el estado

adjunto en Cell-ELISA.

1)-3-2 Cell-ELISA

Después de la eliminación del sobrenadante de cultivo de las células HEK293 α transfectadas con vector de expresión preparadas en el Ejemplo 1)-1-1, se añadió cada sobrenadante de cultivo de hibridoma a las células HEK293 α transfectadas con ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D, o ADNpc3.1-DEST, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS que contiene FBS al 5%. Entonces, se agregó a esto IgG Anti-Rata, Ab de cabra entero enlazado a HRP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) diluido 500 veces con PBS que contiene FBS al 5%, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Entonces, una solución de cromógeno OPD (solución OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) y se agregó H₂O₂ disuelto en concentraciones de 0.4 mg/mL y 0.6% (v/v), respectivamente, en citrato de trisodio 0.05 M y dodecahidrato de fosfato ácido de disodio 0.1 M, pH 4.5)) a una concentración de 100 μ L/pocillo. La reacción de color se realizó con agitación ocasional y se detuvo mediante la adición de HCL 1 M a una concentración de 100 μ L/pocillo. Luego, se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placa (ENVISION; PerkinElmer, Inc.) con objeto de seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo que se una específicamente a GPRC5D humano expresado en la superficie de la membrana celular, los hibridomas que produjeron un sobrenadante de cultivo que exhiben una absorbancia más alta para las células HEK293 α transfectadas con vector de expresión ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D en comparación con células HEK293 α transfectadas con ADNpc3.1-DEST de control se seleccionaron como hibridomas positivos para la producción de anticuerpos anti-GPRC5D humanos.

1)-4 Anticuerpos de detección por citometría de flujo

1)-4-1 Preparación de la célula que expresa el gen del antígeno para el análisis de citometría de flujo

Se inocularon células HEK293T (Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 4×10^5 células/mL a un matraz de 225 cm² y se cultivaron durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contiene FBS al 10%. En el día siguiente, se transfectó ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D o ADNpc3.1-DEST de control a las células HEK293T utilizando Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific Inc.), y las células se cultivaron de manera adicional durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, las células HEK293T transfectadas con el vector de expresión se trataron con TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific Inc.), se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10% y luego se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS que contiene FBS al 5%. La suspensión celular obtenida se usó en análisis de citometría de flujo.

1)-4-2 Análisis de citometría de flujo

La especificidad de unión a GPRC5D humana del anticuerpo producido por cada hibridoma determinado como positivo por Cell-ELISA en el Ejemplo 1)-3 se confirmó de manera adicional por citometría de flujo. Cada suspensión de células HEK293T preparada en el Ejemplo 1)-4-1 se inoculó a una concentración de 100 μ L/pocillo en una microplaca con fondo en U de 96 pocillos y se centrifugó para eliminar un sobrenadante. Las células HEK293T transfectadas con ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D o las

células HEK293T transfectadas con ADNpc3.1-DEST se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de hibridoma y se dejó reposar a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron una vez con PBS que contiene FBS al 5%, después se suspendió mediante la adición de Ab anti-rata de cabra PE (BD) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5%, y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, y luego se vuelve a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido de detección utilizando un citómetro de flujo (FACSCanto (TM) II:BD). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia de PE de la fracción celular se trazó en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibe un cambio de intensidad de fluorescencia más fuerte en el histograma de las células HEK293T transfectadas con ADNpc3.1-DEST-hGPCR5D en comparación con el histograma de intensidad de fluorescencia de las células HEK293T transfectadas con ADNpc3.1-DEST de control fueron seleccionadas como hibridomas que producen el anticuerpo GPCR5D anti-humano.

1)-5 Selección de anticuerpos por ensayo ADCC

1)-5-1 Preparación de células que expresan establemente β -galactosidasa

Las células HEK293FT (Thermo Fisher Scientific Inc.) se transfectaron con pLenti6/V5-GW/LacZ y mezcla empacada ViraPower (TM) (Thermo Fisher Scientific Inc.) de acuerdo con los protocolos adjuntos para preparar un lentivirus recombinante que expresa el gen β -galactosidasa. Las células HEK293T fueron infectadas por el lentivirus recombinante obtenido de acuerdo con el protocolo de los Sistemas de Expresión Lentiviral ViraPower (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las células infectadas por virus se seleccionaron usando Blasticidin 10 g/mL (Thermo Fisher Scientific Inc.) para obtener una línea que expresa establemente β -galactosidasa. Estas células HEK293T que expresan establemente β -galactosidasa (de aquí en adelante, "células 293T-lacZ") se usaron como células blanco en el ensayo de actividad de ADCC.

1)-5-2 Preparación de la célula blanco

Las células 293T-lacZ obtenidas en el Ejemplo 1)-5-1 se inocularon a una concentración de 5×10^5 células/mL a un matraz de 75 cm² y se cultivaron durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contiene FBS al 10%. En el día siguiente, se transfectó ADNpc3.1-DEST-hGPCR5D o ADNpc3.1-DEST de control a las células 293T-lacZ utilizando Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific Inc.), y las células se cultivaron de manera adicional durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, las células 293T-lacZ transfectadas con vector de expresión se trataron con TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 libre de rojo fenol que contenía FBS al 5% (Thermo Fisher Scientific Inc.) (en adelante, denominado "medio para ADCC"). El número de células vivas se contó mediante la prueba de exclusión de colorante azul de tripano. Las células se vuelven a suspender a 1×10^5 células/mL en un medio para ADCC y se usaron como células blanco.

1)-5-3 Preparación de la célula efectora

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) recolectadas de la sangre de un voluntario de acuerdo con el método estándar usando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-

Sciences Corp.) se suspendieron en un medio RPMI1640 libre de fenol rojo que contenía FBS al 10% (Thermo Fisher Scientific Inc.), centrifugado y luego se vuelve a suspender. El número de células vivas se contó mediante la prueba de exclusión de colorante azul de tripano. Después de la centrifugación, se retiró el medio, y las células se suspendieron y ajustó a 2×10^6 células/mL en un medio para la ADCC y se utilizó como células efectoras.

1)-5-4 Preparación de sobrenadante de cultivo de hibridoma

La concentración de cada sobrenadante de cultivo de hibridoma productor de anticuerpo rata anti-GPRC5D de rata obtenida en el Ejemplo 1)-4 se midió utilizando el kit de cuantificación FastELISA IgG ELISA (RD-Biotech) y se ajustó a $10 \mu\text{g/mL}$ (concentración final) con Medio de selección E ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.).

1)-5-5 ensayo ADCC

Las células 293T-lacZ obtenidas en el Ejemplo 1)-5-2 se añadieron a una concentración de $50 \mu\text{L/pocillo}$ a una microplaca de 96 pocillos de fondo en U. Cada sobrenadante de cultivo de hibridoma preparado en el Ejemplo 1)-5-4, o un anticuerpo anti-GPRC5D IgG2b de ratón (R&D Systems, Inc.) para un control positivo o un anticuerpo de control de ratón (mIgG2b) (R&D Systems, Inc.) para un control negativo ajustado a $10 \mu\text{g/mL}$ se añadió (concentración final) a la misma a una concentración de $50 \mu\text{L/pocillo}$, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 1)-5-3 se añadieron de manera adicional a la misma a una concentración de $50 \mu\text{L/pocillo}$. La placa se centrifugó a 1200 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de cultivo a 37°C durante 18 horas bajo condiciones de CO_2 al 5%. Se recuperó $50 \mu\text{L}$ del sobrenadante en cada pocillo en una placa blanca (Corning Inc.). Una solución del sistema de ensayo β -Glo se añadió (Promega Corp.) a la misma en una cantidad de $50 \mu\text{L/pocillo}$. La intensidad de luminiscencia se midió usando un lector de placas (ENVISION; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A-B)/(C-B) \times 100$$

A: recuento del pocillo de muestra

B: Recuento de liberación promedio espontánea (pocillos complementados ni con el anticuerpo ni las células efectoras) ($n = 3$). Se realizó la misma operación que en el pocillo de la muestra, excepto que se agregaron $50 \mu\text{L}$ de un medio para ADCC en lugar del sobrenadante de cultivo de hibridoma y las células efectoras.

C: Recuento promedio de la liberación máxima (pocillos que contienen células blanco lisadas en un tensoactivo) ($n = 3$). Se agregaron $50 \mu\text{L}$ de un medio para ADCC en lugar del sobrenadante de cultivo de hibridoma y las células efectoras. Para el ensayo, se agregó $150 \mu\text{L}$ de la solución de sistema de ensayo β -Glo a cada pocillo que contiene las células y se mezcla con ella. Se añadió una parte alícuota de $100 \mu\text{L}$ de la misma a una placa blanca para llevar a cabo el ensayo.

La actividad ADCC contra las células 293T-lacZ transfectadas con ADNpc3.1-DEST-hGPRC5D o las células 293T-lacZ transfectadas con ADNpc3.1-DEST se calculó de acuerdo con el método descrito anteriormente para seleccionar clones de hibridoma que exhiben actividad ADCC específica para las

células 293T-lacZ transfectadas con ADNpc3.1-DEST-hGPCR5D y produjeron un anticuerpo que exhibe una actividad de ADCC mayor que la del anticuerpo de control positivo.

1)-6 Formación de isotipos de anticuerpos

Se seleccionaron 2A4, 2B1 y 7B4 que sugieren una fuerte unión a GPCR5D humano y que tienen una alta actividad de ADCC en el Ejemplo 1)-5 de entre los hibridomas que producen anticuerpos anti-GPCR5D de rata obtenidos en el Ejemplo 1)-4, y se identificaron por formación de isotipos de anticuerpos. Los isotipos se determinaron utilizando el kit de prueba de formación de isotipos monoclonal de rata (AbD Serotec). Como resultado, se confirmó que todos los isotipos de los anticuerpos monoclonales anti-GPCR5D de rata 2A4, 2B1 y 7B4 son cadenas IgG2b y κ .

1)-7 Preparación de anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal anti-GPCR5D de rata se purificó del sobrenadante de cultivo de hibridoma. Primero, se permitió que el hibridoma productor de 2A4, 2B1 y 7B4 creciera en una cantidad suficiente en Medio ClonaCell-HY Selection E (StemCell Technologies Inc.). A continuación, el medio se reemplazó con un hibridoma SFM (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contiene 5 μ g/mL de gentamicina (Thermo Fisher Scientific Inc.) suplementado con Ultra Low IgG FBS al 20% (Thermo Fisher Scientific Inc.), seguido de cultivo por 5 días. Este sobrenadante de cultivo se recuperó y se esterilizó a través de un filtro de 0.45 μ m.

Cada anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante de hibridoma en una etapa mediante cromatografía de afinidad de proteína G (de 4 a 6°C). Una etapa de reemplazo de la solución amortiguadora después de la purificación por cromatografía de afinidad con proteína G se llevó a cabo a 4 a 6°C. Primero, se aplicó el sobrenadante de cultivo de hibridoma a una columna empaquetada con proteína G (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS. Después de la entrada de toda la solución de sobrenadante de cultivo en la columna, la columna se lavó con PBS en una cantidad de dos veces o más el volumen de la columna. A continuación, las fracciones que contenían anticuerpos se recogieron por elución con una solución acuosa de glicina/ácido clorhídrico 0.1 M (pH 2.7). Las fracciones recogidas se ajustaron a pH 7.0 a 7.5 mediante la adición de Tris-HCl 1 M (pH 9.0). Luego, la solución amortiguadora se reemplazó con HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5%, pH 6.0) usando el dispositivo de filtro centrífugo UF VIVASPIN20 (límite de peso molecular: UF30K, Sartorius Japan K.K., a 4 a 6°C) mientras el anticuerpo se concentró y ajustó a una concentración de anticuerpo de 1 mg/mL o superior. Finalmente, el concentrado se filtró a través del filtro Minisart-Plus (Sartorius Japan K.K.) y se usó como muestra purificada.

Ejemplo 2. Evaluación *in vitro* de anticuerpos anti-GPCR5D de rata (2A4, 2B1 y 7B4)

2)-1 Estudio sobre la actividad de unión de los anticuerpos anti-GPCR5D de rata obtenidos (2A4, 2B1 y 7B4) contra GPCR5D humano mediante citometría de flujo

Las células de la línea celular de mieloma múltiple humana KHM-1B (JCRB Cell Bank) que expresaban GPCR5D se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 μ L/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos, y se centrifuga para eliminar un sobrenadante. Cada anticuerpo anti-GPCR5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4)

ajustado a 0.32 ng/mL a 10 µg/mL en el Ejemplo 1)-7 se añadió a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C por 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Entonces, se agregó Ab anti-rata de cabra PE (Becton, Dickinson and Company) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% al mismo a una concentración de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se vuelven a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto (TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia de PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). Como se muestra en la FIG. 1, se encontró que 2A4, 2B1 y 7B4 se unen al GPRC5D humano (2A4 MFI (max): 1153, 2A4 Kd: 0.5 nM, 2B1 MFI (max): 2386, 2B1 Kd: 14.8 nM, 7B4 MFI (máx.): 2492, 7B4 Kd: 1.3 nM). La citometría de flujo también se llevó a cabo utilizando células KMS-34 de la línea celular de mieloma múltiple humano (JCRB Cell Bank) que expresan GPRC5D y produjo resultados similares (2A4 MFI (máx.): 2064, 2A4 Kd: 1.4 nM, 2B1 MFI (máx.): 3157, 2B1 Kd: 12.7 nM, 7B4 MFI (máx.): 4471, 7B4 Kd: 2.1 nM).

2)-2 Identificación del epítipo para los anticuerpos anti-GPRC5D de rata obtenidos (2A4, 2B1 y 7B4)

2)-2-1 Identificación del epítipo por ELISA

Los epítopos unidos por los anticuerpos anti-GPRC5D de rata obtenidos (2A4, 2B1 y 7B4) se identificaron usando un péptido amino-terminal GPRC5D humano MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILE (Biotina)-NH₂ (Sigma-Aldrich Corp.) (SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias; FIG. 2) que tiene un péptido carboxi terminal biotinilado y que carece de un enlace disulfuro formado intramolecularmente, y un péptido amino-terminal GPRC5D humano MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILE-K(Biotina)-NH₂ (Peptide Institute, Inc.) (SEQ ID NO: 2 del Listado de secuencias; FIG. 3) que tiene una terminal carboxi biotinilada que contiene lisina y que tiene un enlace disulfuro formado intramolecularmente. Cada péptido diluido con PBS se añadió al Inmovilizador Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc.), y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBST, se añadió FBS que contiene BSA al 1%, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBST, cada anticuerpo anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4) preparado en el Ejemplo 1)-7 y diluido a 0.1 ng/mL hasta 1 µg/mL con PBS se añadió a la misma, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBST, se añadió a la misma Ab de cabra entero enlazado a HRP, IgG anti-rata (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) diluido 500 veces con PBS, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBST, se añadió al mismo el sustrato pico quimioluminiscente ELISA SuperSignal (TM) (Thermo Fisher Scientific Inc.), y se midió la luminiscencia usando un lector de placa (ENVISION; PerkinElmer, Inc.). Como resultado, el anticuerpo 2B1 se unió a la secuencia de péptido amino-terminal de GPRC5D humano mientras que los anticuerpos 2A4 y 7B4 no se unieron a esto, sin tener en cuenta la presencia o ausencia de un enlace disulfuro. Estos resultados sugieren que el epítipo para el anticuerpo 2B1 estaba presente en la región amino-terminal de GPRC5D humano, mientras que los epítopos para los anticuerpos 2A4 y 7B4 estaban presentes en regiones distintas al extremo amino.

2)-2-2 Identificación del epítipo por citometría de flujo

Las células KMS-34 de línea celular de mieloma múltiple humano que expresaban GPRC5D se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 μ L/pocillo en una microplaca con fondo en U de 96 pocillos, y se centrifuga para eliminar un sobrenadante. Cada anticuerpo anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4) ajustado a 7.5 μ g/mL en el Ejemplo 1)-7, o anticuerpo de control de isotipo IgG2b de rata (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL)) se agregó a esto en una cantidad de 100 μ L/pocillo. Los dos tipos de péptidos usados en el Ejemplo 2)-2-1 se ajustaron cada uno a 17 ng/mL hasta 34 μ g/mL con PBS y se añaden en una cantidad de 100 μ L/pocillo a los pocillos que contienen la dilución de anticuerpos, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Entonces, se agregó Ab anti-rata de cabra PE (Becton, Dickinson and Company) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% a esto en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se vuelven a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto (TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia de PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de MFI del anticuerpo de control se resta del valor de MFI del anticuerpo GPRC5D para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como se muestra en las FIGS. 4A-4B (se presentó el enlace disulfuro intramolecular (FIG. 4A) o ausente (FIG. 4B)), se encontró que la unión de 2B1 estaba inhibida por la adición del péptido amino-terminal de GPRC5D humano, sin tener en cuenta la presencia o ausencia de un enlace disulfuro. Por el contrario, se encontró que la unión de los anticuerpos 2A4 y 7B4 no se inhibía mediante la adición del péptido amino-terminal de GPRC5D humano. Estos resultados sugieren que el epítipo para el anticuerpo 2B1 estaba presente en la región amino-terminal de GPRC5D humano, mientras que los epítopos para los anticuerpos 2A4 y 7B4 estaban presentes en regiones distintas al extremo amino.

2)-3 Evaluación de la actividad de ADCC de los anticuerpos anti-GPRC5D de rata obtenidos (2A4, 2B1 y 7B4)

2)-3-1 Preparación de la célula blanco

Se ajustaron células KHM-1B de línea celular de mieloma múltiple humano a una concentración de 2×10^6 células/mL con un medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10% (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se añadió 100 μ L de radionúclido cromo-51 (PerkinElmer, Inc.) por mL de la suspensión celular, y las células se cultivaron a 37°C durante 2 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10%, luego se vuelve a suspender a 2×10^5 células/mL en un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% y se usaron como células blanco.

2)-3-2 Preparación de la célula efectora

Las PBMC preparadas en el Ejemplo 1)-5-3 se diferenciaron en células NK usando BINKIT (Instituto de Bioterapia de Japón). Las células NK se ajustaron hasta 1×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se usaron como células efectoras.

2)-3-3 Ensayo de ADCC

Las células KHM-1B preparadas en el Ejemplo 2)-3-1 se añadieron a una concentración de 50 μ L/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos. Cada anticuerpo anti-GPRC5D de rata obtenido (2A4, 2B1 y 7B4) o un anticuerpo de control de rata (rIgG2b) ajustado a 0.5081 ng/mL hasta 10 μ g/mL (concentración final) se añadió al mismo en una cantidad de 50 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 2)-3-2 se añadieron de manera adicional a las mismas en una cantidad de 100 μ L/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1200 rpm durante 3 minutos, las células se cultivaron a 37°C durante 4 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Una alícuota de 50 μ L del sobrenadante se recuperó en LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se seca durante la noche a 50°C, seguido de la medición utilizando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas por la actividad ADCC se calculó de acuerdo con el Ejemplo 1)-5-5. Como se muestra en la FIG. 5, se encontró que 2A4, 2B1 y 7B4 tenían actividad ADCC.

Ejemplo 3. Formación de secuencias de ADNcs que codifican regiones variables de anticuerpos anti-GPRC5D de rata (2A4, 2B1, y 7B4)

3)-1 Formación de secuencias de ADNcs que codifica regiones variables de 2A4

3)-1-1 Preparación de ARN total a partir de hibridoma que produce 2A4

Con objeto de amplificar los ADNcs que codifican las regiones variables de 2A4, se preparó ARN total a partir del hibridoma que produce 2A4 usando Reactivo TRIzol (Ambion/Thermo Fisher Scientific Inc.).

3)-1-2 Síntesis de ADNc (5'-RACE-Ready ADNc)

Los ADNcs (ADNcs 5'-RACE-Ready) se sintetizaron usando aproximadamente 1 μ g del ARN total preparado en el Ejemplo 3)-1-1, y kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

3)-1-3 Amplificación y formación de secuencias de ADNc que codifica región variable de cadena pesada de 2A4 por 5'-RACE PCR

Los cebadores usados para la amplificación PCR del ADNc que codifica la región variable del gen de cadena pesada de 2A4 fueron oligonucleótidos que tienen las secuencias de UPM (Mezcla de Cebador A Universal; enlazada al kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE) y 5'-CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3' (RG2AR3: SEQ ID NO: 3 (FIG. 6)). La UPM usada se enlazó al kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), mientras que RG2AR3 fue diseñada a partir de las secuencias de regiones constantes de cadena pesada de rata registradas en la base de datos.

El ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2A4 se amplificó por 5'-RACE PCR usando este conjunto cebador y los ADNcs (ADNcs 5'-RACE-Ready) sintetizados en el Ejemplo 3)-1-2 como plantillas. Esta PCR se llevó a cabo en el programa Touchdown PCR de acuerdo con el manual del kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

El ADC que codifica la región variable de cadena pesada amplificado por 5'-RACE PCR se

purificó usando el kit de Purificación MinElute PCR (Qiagen N.V.) y luego se clona usando el Kit de Clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada clonado se sometió a análisis de secuencias.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 4 (FIG. 8), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 5 (FIG. 9).

3)-1-4 Amplificación y formación de secuencias de ADNc que codifica región variable de cadena ligera de 2A4 por 5'-RACE PCR

Los cebadores usados para la amplificación PCR del ADNc que codifica la región variable del gen de cadena ligera de 2A4 fueron oligonucleótidos que tienen las secuencias de UPM (Mezcla de Cebador A Universal; enlazada al kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE) y 5'-TCAGTAACACTGTCCAGGACACCATCTC-3' (RKR5: SEQ ID NO: 10 (FIG. 7)). La UPM usada se enlazó al kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.), mientras que RKR5 fue diseñada a partir de las secuencias de regiones constantes de cadena ligera de rata registradas en la base de datos.

El ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2A4 se amplificó por 5'-RACE PCR usando este conjunto cebador y los ADNcs (ADNcs 5'-RACE-Ready) sintetizados en el Ejemplo 3)-1-2 como plantillas. Esta PCR se llevó a cabo en el programa Touchdown PCR de acuerdo con el manual del kit de Amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

El ADNc que codifica la región variable de cadena ligera amplificado por 5'-RACE PCR se purificó usando el Kit de Purificación MinElute PCR (Qiagen N.V.) y luego se clona usando el Kit de Clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera clonado se sometió a análisis de secuencias.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2A4 se muestra en SEQ ID NO: 11 (FIG. 14), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 12 (FIG. 15).

3)-2 Formación de secuencias de ADNcs que codifica regiones variables de 2B1

Las secuencias se determinaron de la misma manera como en el Ejemplo 3)-1.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2B1 se muestra en SEQ ID NO: 6 (FIG. 10), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 7 (FIG. 11). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 13 (FIG. 16), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 14 (FIG. 17).

3)-3 Formación de secuencias de ADNcs que codifican regiones variables de 7B4

Las secuencias se determinaron de la misma manera como en el Ejemplo 3)-1.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 7B4 se muestra en SEQ ID NO: 8 (FIG. 12), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 9 (FIG. 13). La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable

de cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 15 (FIG. 18), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 16 (FIG. 19).

Ejemplo 4. Preparación de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4)

4)-1 Construcción de vector de expresión de cadena ligera quimérico y humanizado pCMA-LK

5 Se digirió un plásmido pADNc3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) con enzimas de restricción XbaI y PmeI. El fragmento obtenido de aproximadamente 5.4 kb se fusionó con un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN (mostrada en SEQ ID NO: 17 (FIG. 20) del Listado de Secuencias) que codifica una señal secretora de cadena ligera humana y una región constante de cadena κ humana usando un kit de clonación In-Fusion Advantage PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar

10 pADNc3.3/LK.

Se realizó la PCR con pADNc3.3/LK como una plantilla usando el conjunto cebador mostrado a continuación. El fragmento obtenido de aproximadamente 3.8 kb se fosforiló y luego se auto-ligó al constructo un vector de expresión de cadena ligera quimérico y humanizado pCMA-LK que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal, un sitio de clonación, y la región constante

15 de cadena κ humana, corriente abajo del promotor CMV.

Conjunto cebador

5'-TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC-3' (3.3-F1: SEQ ID NO: 18 del Listado de Secuencias; FIG. 21)

5'-GCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTG-3' (3.3-R1: SEQ ID NO: 19 del Listado de Secuencias; FIG. 22)

20

4)-2 Construcción de vector de expresión de cadena pesada tipo IgG1 quimérico y humanizado pCMA-G1

El pCMA-LK se digirió con XbaI y PmeI. El fragmento de ADN obtenido excepto para la secuencia de ADN que codifica la señal secretora de cadena ligera y la región constante de cadena κ humana se fusionó con un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN (mostrada en SEQ ID NO: 20 (FIG. 23) del Listado de Secuencias) que codifica los aminoácidos de una secuencia de señal de cadena pesada humana y una región constante IgG1 humana usando kit de clonación In-Fusion Advantage PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de cadena pesada tipo IgG1 quimérico y humanizado pCMA-G1 que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal, un sitio de clonación, y la región constante de cadena pesada IgG1 humana, corriente abajo del promotor CMV.

25

30 4)-3 Construcción de c2A4 vector de expresión de cadena ligera

Un fragmento de ADN que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera se amplificó mediante PCR usando el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera 2A4 obtenido en el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación, y se inserta al sitio de escisión BsiWI de la enzima de restricción del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo humanizado quimérico y humanizado pCMA-LK usando kit de clonación In-Fusion Advantage PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de cadena ligera c2A4. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/c2A4". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera c2A4 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena ligera se muestran en SEQ ID NOs: 21 y 22 (FIGS.

35

24 y 25), respectivamente, del Listado de Secuencias.

Conjunto cebador para c2A4 cadena ligera

5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACACAGTCTCCAGC-3' (c2A4-LF: SEQ ID NO: 23 del Listado de Secuencias; FIG. 26)

5 5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAATTCCAGCTTGGTGCCTC-3' (c2A4-LR: SEQ ID NO: 24 del Listado de Secuencias; FIG. 27)

4)-4 Construcción del vector de expresión de cadena pesada c2A4

Un fragmento de ADN que comprende un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada se amplificó mediante PCR usando el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada 2A4
 10 obtenido en el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación, y se inserta a el sitio de escisión de la enzima de restricción BlnI del vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-G1 usando el kit de clonación In-Fusion Advantage PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de cadena pesada c2A4. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/c2A4". La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada
 15 c2A4 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 25 y 26 (FIGS. 28 y 29), respectivamente, del Listado de Secuencias.

Conjunto cebador para cadena pesada c2A4

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTCCAGTTGCAGCAATCTGGAGCTG-3' (c2A4-HF: SEQ ID NO: 27 del Listado de Secuencias; FIG. 30)

20 5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACTGTGACCATGACTCCTTGGCCCCAG-3' (c2A4-HR: SEQ ID NO: 28 del Listado de Secuencias; FIG. 31)

4)-5 Construcción del vector de expresión de cadena ligera c2B1

Un fragmento de ADN que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera se amplificó mediante PCR usando el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera 2B1 obtenido en
 25 el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación. El vector de expresión de cadena ligera c2B1 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 4)-3. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/c2B1". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera c2B1 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena ligera se muestran en SEQ ID NOs: 29 y 30 (FIGS. 32 y 33), respectivamente, del Listado de Secuencias.

30 Conjunto cebador para ccadena ligera 2B1

5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGAACTGTGATGACCCAGTCTCCAC-3' (c2B1-LF: SEQ ID NO: 31 del Listado de Secuencias; FIG. 34)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAATTCCAGCTTGGTGCCTC-3' (c2B1-LR: SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias; FIG. 35)

35 4)-6 Construcción de c2B1 vector de expresión de cadena pesada

Un fragmento de ADN que comprende un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada se amplificó mediante PCR usando el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada 2B1 obtenido en el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación. El vector de

expresión de cadena pesada c2B1 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 4)-4. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA-G1/c2B1”. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada c2B1 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 33 y 34 (FIGS. 36 y 37), respectivamente, del Listado de Secuencias.

5 Conjunto cebador para cadena pesada c2B1

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTG-3' (c2B1-HF: SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias; FIG. 38)

5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACAGTGACCAGAGTGCCTTGGCCCCAG-3' (c2B1-HR: SEQ ID NO: 36 del Listado de Secuencias; FIG. 39)

10 4)-7 Construcción del vector de expresión de cadena ligera c7B4

Un fragmento de ADN que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera se amplificó mediante PCR usando el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera 7B4 obtenido en el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación. Un vector de expresión de cadena ligera c7B4 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 4)-3. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA-LK/c7B4”. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera c7B4 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena ligera se muestran en SEQ ID NOs: 37 y 38 (FIGS. 40 y 41), respectivamente, del Listado de Secuencias.

Conjunto cebador para cadena ligera c7B4

5'-ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC-3' (c7B4-LF: SEQ ID NO: 39 del Listado de Secuencias; FIG. 42)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGTTCCAGCTTGGTCCCAG-3' (c7B4-LR: SEQ ID NO: 40 del Listado de Secuencias; FIG. 43)

4)-8 Construcción del vector de expresión de cadena pesada c7B4

Un fragmento de ADN que comprende un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada se amplificó mediante PCR usando el ADC que codifica la región variable de cadena pesada 7B4 obtenido en el Ejemplo 3) como una plantilla y un conjunto cebador mostrado a continuación. El vector de expresión de cadena pesada c7B4 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 4)-4. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA-G1/c7B4”. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada c7B4 y la secuencia de aminoácidos de esta cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 41 y 42 (FIGS. 44 y 45), respectivamente, del Listado de Secuencias.

Conjunto cebador para cadena pesada c7B4

5'-CCAGATGGGTGCTGAGCGAGATACACCTGCAGGAGTCAGGACCTG-3' (c7B4-HF: SEQ ID NO: 43 del Listado de Secuencias; FIG. 46)

5'-CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACAGTGAAGCTCCTTGACCCCAG-3' (c7B4-HR: SEQ ID NO: 44 del Listado de Secuencias; FIG. 47)

4)-9 Preparación de anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano

4)-9-1 Producción de anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano

Se subcultivaron células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) y se cultivan de acuerdo con el

manual. Se inocularon 1.2×10^9 células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico a un matraz Fernbach Erlenmeyer de 3 L (Corning Inc.), ajustado hasta 2.0×10^6 células/ml por dilución con Medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.), y luego se cultiva con agitación a 90 rpm a 37°C durante 1 hora en una incubadora con CO₂ al 8%. Se disolvió 1.8 mg de polietilenimina (Polysciences #24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). A continuación, cada uno del vector de expresión de cadena pesada (0.24 mg) y vector de expresión de cadena ligera (0.36 mg) preparados usando NucleoBond Xtra (Takara Bio Inc.) se agregaron a 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). Se agregó 20 ml de la solución mezclada vector de expresión/Opti-Pro SFM a 20 ml de la solución mezclada polietilenimina/Opti-Pro SFM, y la mezcla se agitó suavemente, se deja durante 5 minutos, y luego se agrega a las células FreeStyle 293F. Las células se cultivaron por agitación a 90 rpm a 37°C durante 4 horas en una incubadora con CO₂ al 8%. Luego, se agregaron 600 ml de medio EX-CELL VPRO (SAFC Biosciences Inc.), 18 ml de GlutaMAX I (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.), y 30 ml de Yeastolate Ultrafiltrate (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) a esto. Las células se cultivaron por agitación a 90 rpm a 37°C durante 7 días en una incubadora con CO₂ al 8%, y el sobrenadante de cultivo obtenido se filtró a través de Filtro de Cápsula Desechable (Advantec #CCS-045-E1H).

El 2A4 quimérico humano que se obtiene por la combinación de pCMA-G1/c2A4 y pCMA-LK/c2A4 fue designado como “c2A4”. El 2B1 quimérico humano que se obtiene por la combinación de pCMA-G1/c2B1 y pCMA-LK/c2B1 fue designado como “c2B1”. El 7B4 quimérico humano que se obtiene por la combinación de pCMA-G1/c7B4 y pCMA-LK/c7B4 fue designado como “c7B4”.

4)-9-2 Purificación de anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano

Cada anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 4)-9-1 en una etapa por cromatografía de afinidad rProtein A (a 4 hasta 6°C). Una etapa de remplazo de solución amortiguadora después de la purificación por cromatografía de afinidad rProtein A se llevó a cabo a 4 hasta 6°C. El sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna empacada con MabSelectSuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS. Después de la entrada de toda la solución de cultivo en la columna, la columna se lavó con PBS en una cantidad de dos veces o más el volumen de la columna. A continuación, las fracciones que contienen anticuerpos se recolectaron por elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4.0). Las fracciones recolectadas se remplazaron en solución amortiguadora con HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5%, pH 6.0) mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific Inc., Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer). El anticuerpo se concentró y se ajustó hasta una concentración IgG de 10 mg/ml o más alta usando el dispositivo de filtro UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius Japan K.K., 4°C), y se usa como una muestra purificada. Finalmente, esta muestra purificada se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Japan K.K.).

Ejemplo 5. Actividad *in vitro* de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4)

5)-1 Estudio sobre actividad de enlace de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) contra GPRC5D humano mediante citometría de flujo

Se ajustaron células KHM-1B de línea celular de mieloma múltiple humano que expresan GPRC5D hasta una concentración de 5×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon

en una cantidad de 100 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada uno del anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) o anticuerpo de control del isotipo de IgG humano (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 1.2 ng/mL hasta 40 µg/mL se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, se agregó IgG Anti-Humano de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fcγ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de la MFI del anticuerpo de control se restó del valor de la MFI del anticuerpo GPRC5D para calcular un valor relativo de MFI (I). Como se muestra en la FIG. 48, c2A4, c2B1, y c7B4 se encontró que se enlazaban a GPRC5D humano.

5)-2 Estudio sobre reactividad cruzada de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) con GPRC5D de mono cynomolgus

5)-2-1 Construcción de vector de expresión GPRC5D de mono cynomolgus (pADNc3.1-DEST-cGPRC5D)

Un ADNc que codifica la proteína GPRC5D de mono cynomolgus (XP_005570249.1) se clonó en el vector pADNc3.1-DEST preparado en el Ejemplo 1)-1-1 usando Mezcla de enzima clonasa LR de Puerta de Acceso (Life Technologies Corp.) para construir un vector de expresión GPRC5D de mono cynomolgus pADNc3.1-DEST-cGPRC5D. Para la preparación a gran escala del vector de expresión GPRC5D de mono cynomolgus, se usó el kit Endofree Plasmid Giga (Qiagen N.V.).

5)-2-2 Preparación de línea celular que expresa GPRC5D de mono cynomolgus

Una línea celular de mieloma múltiple KMS-11 (JCRB Cell Bank) que expresa no GPRC5D humano se inoculó a una concentración de 3.7×10^5 células/mL a un matraz de 75 cm² usando un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10%. Se transfectó pADNc3.1-DEST-cGPRC5D a las células KMS-11 usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), y las células se cultivaron a 37°C durante 2 días bajo condiciones de CO₂ al 5%. Las células KMS-11 transfectadas con el vector de expresión cultivado se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% y 1 mg/mL Geneticin (Thermo Fisher Scientific Inc.) para cribado de fármaco. Se prepararon células en masa como clones sencillos por el método de dilución limitada usando medio ClonaCell-HY Selection Medium E (StemCell Technologies Inc.) que contiene 1 mg/mL Geneticina (Thermo Fisher Scientific Inc.) para establecer una línea celular de mieloma múltiple que expresa GPRC5D de mono cynomolgus KMS-11_cGPRC5D.

5)-2-3 Estudio sobre actividad de enlace de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) contra GPRC5D de mono cynomolgus mediante citometría de flujo

Las células KMS-11_cGPRC5D preparadas en el Ejemplo 5)-2-2 se ajustaron hasta una

concentración de 5×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 μ L/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada uno del anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) o anticuerpo de control del isotipo de IgG humano (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 1.2 ng/mL hasta 40 μ g/mL se agregó a ello en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, IgG Anti-Humano de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de la MFI del anticuerpo de control se restó del valor de la MFI del anticuerpo GPRC5D para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como se muestra en la FIG. 49, c2A4, c2B1, y c7B4 se encontró que se enlazaban a GPRC5D de mono cynomolgus. El anticuerpo, etc. enlazado a GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus pueden someterse a varias pruebas sobre eficacia o seguridad usando primates, particularmente, monos cynomolgus, útiles para el desarrollo neoclínico (desarrollo preclínico) de productos farmacéuticos, y de esta manera son preferidos. También, el anticuerpo, etc. enlazado a GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus tienen actividad citotóxica y son útiles, ya sea solos o como la molécula de la presente invención, en el tratamiento o prevención de enfermedades tal como cánceres en monos cynomolgus.

Como resultado de estudiar la reactividad cruzada de c2A4, c2B1, y c7B4 con GPRC5D de rata y GPRC5D de ratón de la misma manera como en el Ejemplo 5)-2, ninguno de c2A4, c2B1, y c7B4 se une a GPRC5D de rata y GPRC5D de ratón. En virtud de estos anticuerpos c2A4, c2B1, y c7B4, pueden llevarse a cabo varios ensayos, pruebas inmunohistoquímicas, etc. usando células de ratón o rata transfectadas con el gen GPRC5D humano, tejidos, o individuos (incluyendo animales transgénicos, animales con remplazo de gen, y animales con inactivación de gen) y el anticuerpo, etc., sin estar influenciados por el GPRC5D del ratón hospedero. De esta manera, estos anticuerpos se prefieren para la investigación y desarrollo no clínico, usando ratones o ratas, de fármacos, fármacos veterinarios, o fármacos de diagnóstico, etc., que comprende el anticuerpo, etc.

5)-3 Actividad ADCC de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4)

Las células KHM-1B preparadas en el Ejemplo 2)-3-1 se agregaron en una cantidad de 50 μ L/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos. Cada uno del anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano purificado (c2A4, c2B1, y c7B4) preparado en el Ejemplo 4 o un anticuerpo de control humano (hIgG1) (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 0.64 ng/mL hasta 2 μ g/mL (concentración final) se agregó a ello en una cantidad de 50 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células efectoras (ajustado hasta 3×10^6 células/mL) preparadas en el Ejemplo

1)-5-3 se agregaron además a esto a una concentración de 100 µL/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1200 rpm por 3 minutos, las células se cultivaron a 37°C durante 4 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Una alícuota de 50 µL del sobrenadante se recuperó en LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó durante la noche a 50°C, seguido por medición usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas por actividad ADCC se calculó de acuerdo con Ejemplo 1)-5-5. Como se muestra en la FIG. 50, c2A4, c2B1, y c7B4 se encontraron que tienen actividad ADCC.

Ejemplo 6. Actividad *In vivo* de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4)

se suspendieron 1×10^7 células de una línea celular humana de mieloma múltiple KHM-1B en 100% Matrigel (Becton, Dickinson and Company) y se transplanta subcutáneamente a la región auxiliar de cada ratón BALB/c-nu/nu (CanN.Cg-Foxn1nu/CrICrlj, adquiridos de Charles River Laboratories Japan Inc.). Tres y 10 días después del trasplante, cada uno del anticuerpo anti-GPRC5D quimérico humano (c2A4, c2B1, y c7B4) se administró a una dosis de 10 mg/kg a las venas de la cola de los ratones que presentan cáncer (n = 12 o 11). El eje mayor y eje menor del tumor transplantado se midieron dos veces a la semana usando un calibrador electrónico digital (fabricado por Mitsutoyo Corp.). El volumen tumoral fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Eje menor (mm)} \times \text{Eje menor (mm)} \times \text{Eje mayor (mm)}$$

Los resultados en el anticuerpo c2A4 se muestran en la FIG. 51. El porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral a 21 días después del trasplante fue 96%.

Los resultados en el anticuerpo c2B1 se muestran en la FIG. 52. El porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral a 21 días después del trasplante fue 95%.

Los resultados en el anticuerpo c7B4 se muestran en la FIG. 53. El porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral a 21 días después del trasplante fue 94%.

Ejemplo 7. Diseño de versiones humanizadas (h2B1 y h7B4) de anticuerpos anti-GPRC5D quimérico humano (c2B1 y c7B4)

7)-1 Diseño de forma humanizada de anticuerpo anti-GPRC5D 2B1

7)-1-1 Modelado molecular de regiones variables 2B1

El modelado molecular de las regiones variables 2B1 se llevó a cabo mediante un método generalmente conocido como modelado por homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las regiones variables de 2B1 determinadas anteriormente se compararon con las secuencias primarias (están disponibles estructuras tridimensionales derivadas de estructuras cristalinas de rayos X) de regiones variables de inmunoglobulina humana registradas en el Banco de Datos de Proteínas (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Como resultado, 3MBX se seleccionó debido a que tienen la identidad de secuencia más elevada a las regiones variables de cadena pesada y ligera de 2B1. Las estructuras tridimensionales de regiones de marco se prepararon como un “modelo de marco” al combinar las coordenadas de 3MBX correspondientes a las cadenas pesada y ligera de 2B1. Posteriormente, la conformación típica de cada una de CDR se incorporó en el modelo de marco. Finalmente, el cálculo de energía para excluir contactos interatómicos desventajosos se condujo con objeto de obtener modelos

moleculares posibles de las regiones variables 2B1 en términos de energía. Estos procedimientos se llevaron a cabo usando un programa comercialmente disponible para análisis de estructura tridimensional de proteínas BioLuminate (fabricado por Schrodinger, LLC).

7)-1-2 Diseño de secuencia de aminoácidos de h2B1 humanizada

5 La H2B1 humanizada se construyó mediante un método generalmente conocido como injertado CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Un anticuerpo aceptor se seleccionó con base en la identidad de los aminoácidos en regiones de marco.

Las secuencias de las regiones de marco de 2B1 se compararon con las regiones de marco de las secuencias de consenso del subgrupo humano o las secuencias de línea germinal especificadas por
 10 KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Como resultado, las secuencias de línea germinal humanas IGHV2_5x08 y IGHJ1x01 y una secuencia de consenso del subgrupo 2 de cadena gamma humana se seleccionaron como un aceptor de cadena pesada mientras que las secuencias de línea germinal humanas IGKV1_8x01 y IGKJ4x01 y una secuencia de consenso del subgrupo 4 de cadena kappa
 15 humana se seleccionaron como aceptor de cadena ligera debido a su alta identidad de secuencia hacia regiones de marco. Los residuos de aminoácido de las regiones de marco de los aceptores se alinearon con los residuos de aminoácido de las regiones de marco 2B1 para identificar las posiciones de aminoácidos que no se emparejan entre ellos. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de 2B1 construido anteriormente. Luego, los residuos donadores a injertarse sobre
 20 los aceptores se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Algunos residuos donadores de esta manera seleccionados se transfirieron al anticuerpo aceptor para construir la secuencia h2B1 humanizada como se describe en los siguientes Ejemplos. La cadena pesada no estuvo limitada por los residuos donadores, y dependiendo de un sitio, los residuos de una secuencia de consenso del subgrupo 1 de cadena gamma se transfirieron a
 25 esto.

7)-1-3 Humanización de cadena pesada 2B1

7)-1-3-1 cadena pesada tipo h2B1_H1 humanizada

Una cadena pesada h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 34 mediante el reemplazo en la región variable de treonina en la posición de
 30 aminoácido 3 con glutamina, lisina en la posición de aminoácido 5 con valina, prolina en la posición de aminoácido 9 con glicina, isoleucina en la posición de aminoácido 11 con leucina, leucina en la posición de aminoácido 12 con valina, glutamina en la posición de aminoácido 13 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, leucina en la posición de aminoácido 50 con isoleucina, alanina en la posición de aminoácido 51 con glicina, arginina en la posición de aminoácido 66 con lisina, asparagina en
 35 la posición de aminoácido 67 con serina, leucina en la posición de aminoácido 69 con valina, lisina en la posición de aminoácido 73 con valina, asparagina en la posición de aminoácido 77 con lisina, fenilalanina en la posición de aminoácido 81 con serina, isoleucina en la posición de aminoácido 84 con leucina, treonina en la posición de aminoácido 85 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 86 con

serina, ácido aspártico en la posición de aminoácido 88 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 89 con alanina, y treonina en la posición de aminoácido 94 con valina fue designada como “cadena pesada tipo h2B1_H1 humanizada” (también referida como “h2B1_H1”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h2B1_H1 humanizada se describe en SEQ ID NO: 74 (FIG. 83) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 se describe en SEQ ID NO: 73 (FIG. 82) del Listado de Secuencias.

7)-1-3-2 Cadena pesada tipo h2B1_H2 humanizada

Una cadena pesada h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 34 mediante el reemplazo en la región variable de treonina en la posición de aminoácido 3 con glutamina, lisina en la posición de aminoácido 5 con valina, prolina en la posición de aminoácido 9 con glicina, isoleucina en la posición de aminoácido 11 con leucina, leucina en la posición de aminoácido 12 con valina, glutamina en la posición de aminoácido 13 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, leucina en la posición de aminoácido 50 con isoleucina, alanina en la posición de aminoácido 51 con glicina, arginina en la posición de aminoácido 66 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 67 con serina, leucina en la posición de aminoácido 69 con valina, fenilalanina en la posición de aminoácido 81 con serina, isoleucina en la posición de aminoácido 84 con leucina, treonina en la posición de aminoácido 85 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 86 con serina, ácido aspártico en la posición de aminoácido 88 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 89 con alanina, y treonina en la posición de aminoácido 94 con valina fue designada como “cadena pesada tipo h2B1_H2 humanizada” (también referida como “h2B1_H2”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h2B1_H2 humanizada se describe en SEQ ID NO: 76 (FIG. 85) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 se describe en SEQ ID NO: 75 (FIG. 84) del Listado de Secuencias.

7)-1-3-3 cadena pesada tipo h2B1_H3 humanizada

La cadena pesada h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 34 mediante el reemplazo en la región variable de treonina en la posición de aminoácido 3 con glutamina, lisina en la posición de aminoácido 5 con valina, prolina en la posición de aminoácido 9 con glicina, isoleucina en la posición de aminoácido 11 con leucina, leucina en la posición de aminoácido 12 con valina, glutamina en la posición de aminoácido 13 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, leucina en la posición de aminoácido 50 con isoleucina, arginina en la posición de aminoácido 66 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 67 con serina, leucina en la posición de aminoácido 69 con valina, fenilalanina en la posición de aminoácido 81 con serina, isoleucina en la posición de aminoácido 84 con leucina, treonina en la posición de aminoácido 85 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 86 con serina, ácido aspártico en la posición de aminoácido 88 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 89 con alanina, y treonina en la posición de aminoácido 94 con valina fue designada como “cadena pesada tipo h2B1_H3 humanizada”

(también referida como “h2B1_H3”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h2B1_H3 humanizada se describe en SEQ ID NO: 78 (FIG. 87) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 se describe en SEQ ID NO: 77 (FIG. 86) del Listado de Secuencias.

7)-1-3-4 cadena pesada tipo h2B1_H4 humanizada

Una cadena pesada h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 34 mediante el reemplazo en la región variable de glicina en la posición de aminoácido 10 con alanina, isoleucina en la posición de aminoácido 11 con leucina, leucina en la posición de aminoácido 12 con valina, glutamina en la posición de aminoácido 13 con lisina, serina en la posición de aminoácido 15 con treonina, serina en la posición de aminoácido 19 con treonina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, asparagina en la posición de aminoácido 62 con serina, arginina en la posición de aminoácido 66 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 67 con serina, serina en la posición de aminoácido 72 con treonina, fenilalanina en la posición de aminoácido 81 con valina, lisina en la posición de aminoácido 83 con treonina, isoleucina en la posición de aminoácido 84 con metionina, valina en la posición de aminoácido 87 con metionina, treonina en la posición de aminoácido 89 con prolina, y alanina en la posición de aminoácido 90 con valina fue designada como “cadena pesada tipo h2B1_H4 humanizada” (también referida como “h2B1_H4”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h2B1_H4 humanizada se describe en SEQ ID NO: 80 (FIG. 89) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 se describe en SEQ ID NO: 79 (FIG. 88) del Listado de Secuencias.

7)-1-4 Humanización de cadena ligera 2B1

7)-1-4-1 Cadena ligera tipo h2B1_L1 humanizada

Una cadena ligera h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 30 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 con ácido aspártico, treonina en la posición de aminoácido 9 con ácido aspártico, metionina en la posición de aminoácido 11 con leucina, serina en la posición de aminoácido 12 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 13 con valina, isoleucina en la posición de aminoácido 15 con leucina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 21 con isoleucina, treonina en la posición de aminoácido 39 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, treonina en la posición de aminoácido 63 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 67 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 77 con serina, valina en la posición de aminoácido 78 con leucina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 79 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 83 con valina, glicina en la posición de aminoácido 100 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 104 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 106 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h2B1_L1 humanizada” (también referida como “h2B1_L1”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo h2B1_L1 humanizada se describe en SEQ ID NO: 64 (FIG. 73) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 se describe en SEQ ID NO: 63 (FIG. 72) del Listado de Secuencias.

7)-1-4-2 Cadena ligera tipo h2B1_L2 humanizada

5 Una cadena ligera h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 30 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 con ácido aspártico, treonina en la posición de aminoácido 9 con ácido aspártico, metionina en la posición de aminoácido 11 con leucina, serina en la posición de aminoácido 12 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 13 con valina, isoleucina en la posición de aminoácido 10 15 con leucina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 21 con isoleucina, treonina en la posición de aminoácido 39 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, treonina en la posición de aminoácido 63 con serina, arginina en la posición de aminoácido 69 con treonina, asparagina en la posición de aminoácido 77 con serina, valina en la posición de aminoácido 78 con leucina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 79 con glutamina, 15 leucina en la posición de aminoácido 83 con valina, glicina en la posición de aminoácido 100 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 104 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 106 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h2B1_L2 humanizada” (también referida como “h2B1_L2”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo h2B1_L2 humanizada se describe en SEQ ID NO: 66 (FIG. 75) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 se describe en SEQ ID NO: 65 (FIG. 74) del Listado de Secuencias.

7)-1-4-3 cadena ligera tipo h2B1_L3 humanizada

Una cadena ligera h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera quimérica c2B1 mostrada en SEQ ID NO: 30 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la 25 posición de aminoácido 1 con ácido aspártico, treonina en la posición de aminoácido 9 con ácido aspártico, metionina en la posición de aminoácido 11 con leucina, serina en la posición de aminoácido 12 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 13 con valina, isoleucina en la posición de aminoácido 15 con leucina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 21 con isoleucina, treonina en la posición de aminoácido 39 con lisina, serina en la posición de aminoácido 43 con prolina, treonina en la posición de aminoácido 63 con serina, asparagina en la 30 posición de aminoácido 77 con serina, valina en la posición de aminoácido 78 con leucina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 79 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 83 con valina, glicina en la posición de aminoácido 100 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 104 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 106 con isoleucina fue designada como “cadena ligera 35 tipo h2B1_L3 humanizada” (también referida como “h2B1_L3”).

La secuencia de aminoácidos de the cadena ligera tipo h2B1_L3 humanizada se describe en SEQ ID NO: 68 (FIG. 77) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 se describe en SEQ ID NO: 67 (FIG. 76) del Listado de Secuencias.

7)-1-4-4 cadena ligera tipo h2B1_L4 humanizada

Una cadena ligera h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera c2B1 quimérica mostrada en SEQ ID NO: 30 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 con ácido aspártico, treonina en la posición de aminoácido 9 con ácido aspártico, metionina en la posición de aminoácido 11 con leucina, serina en la posición de aminoácido 12 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 13 con valina, isoleucina en la posición de aminoácido 15 con leucina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 21 con isoleucina, treonina en la posición de aminoácido 39 con lisina, treonina en la posición de aminoácido 63 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 77 con serina, valina en la posición de aminoácido 78 con leucina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 79 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 83 con valina, glicina en la posición de aminoácido 100 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 104 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 106 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h2B1_L4 humanizada” (también referida como “h2B1_L4”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo h2B1_L4 humanizada se describe en SEQ ID NO: 70 (FIG. 79) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 se describe en SEQ ID NO: 69 (FIG. 78) del Listado de Secuencias.

7)-1-4-5 Cadena ligera tipo h2B1_L5 humanizada

Una cadena ligera h2B1 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera quimérica c2B mostrada en SEQ ID NO: 30 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 con alanina, valina en la posición de aminoácido 3 con arginina, treonina en la posición de aminoácido 9 con serina, metionina en la posición de aminoácido 11 con fenilalanina, treonina en la posición de aminoácido 13 con alanina, isoleucina en la posición de aminoácido 15 con treonina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 17 con ácido aspártico, leucina en la posición de aminoácido 21 con isoleucina, asparagina en la posición de aminoácido 22 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 39 con lisina, glutamina en la posición de aminoácido 42 con lisina, ácido aspártico en la posición de aminoácido 60 con serina, treonina en la posición de aminoácido 63 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 77 con serina, valina en la posición de aminoácido 78 con leucina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 79 con glutamina, alanina en la posición de aminoácido 80 con serina, leucina en la posición de aminoácido 83 con fenilalanina, valina en la posición de aminoácido 85 con treonina, leucina en la posición de aminoácido 104 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 106 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h2B1_L5 humanizada” (también referida como “h2B1_L5”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo h2B1_L5 humanizada se describe en SEQ ID NO: 72 (FIG. 81) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 se describe en SEQ ID NO: 71 (FIG. 80) del Listado de Secuencias.

7)-2 Diseño de la forma humanizada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D

7)-2-1 Modelado molecular de regiones variables de 7B4

El modelado molecular de las regiones variables de 7B4 se llevó a cabo mediante un método

generalmente conocido como modelado por homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las regiones variables de 7B4 antes determinadas se compararon con las secuencias primarias (están disponibles estructuras tridimensionales derivadas de estructuras cristalinas de rayos X) de regiones variables de inmunoglobulina humana registradas en el Banco de Datos de Proteínas (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Como resultado, 1BGX se seleccionó debido a que tienen la identidad de secuencia más elevada a las regiones variables de cadena pesada y ligera de 7B4. Las estructuras tridimensionales de regiones de marco se prepararon como un “modelo de marco” al combinar las coordenadas de 1BGX correspondientes a las cadenas pesada y ligera de 7B4. Posteriormente, la conformación típica de cada una de CDR se incorporó en el modelo de marco. Finalmente, el cálculo de energía para excluir contactos interatómicos desventajosos se condujo con objeto de obtener modelos moleculares posibles de las regiones variables 7B4 en términos de energía. Estos procedimientos se llevaron a cabo usando un programa comercialmente disponible para análisis de estructura tridimensional de proteínas BioLuminate (Schrodinger, LLC).

7)-2-2 Diseño de secuencia de aminoácidos de h7B4 humanizada

La h7B4 humanizada se construyó mediante un método generalmente conocido como injertado CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Un anticuerpo aceptor se seleccionó con base en la identidad de los aminoácidos en regiones de marco.

Las secuencias de las regiones de marco de 7B4 se compararon con las regiones de marco de las secuencias de consenso del subgrupo humano o las secuencias de línea germinal especificadas por KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Como resultado, una secuencia de consenso del subgrupo 2 de cadena gamma humana se seleccionó como un aceptor de cadena pesada mientras que una secuencia de consenso del subgrupo 3 de cadena kappa humana se seleccionó como aceptor de cadena ligera debido a su alta identidad de secuencia en cuanto a regiones de marco. Los residuos de aminoácido de las regiones de marco de los aceptores se alinearon con los residuos de aminoácido de las regiones de marco 7B4 para identificar las posiciones de aminoácidos que no se emparejan entre ellas. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de 7B4 construido anteriormente. Luego, los residuos donadores a injertarse sobre los aceptores se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Algunos residuos donadores de esta manera seleccionados se transfirieron al anticuerpo aceptor para construir la secuencia h7B4 humanizada como se describe en los siguientes Ejemplos. La cadena ligera no estuvo limitada por los residuos donadores, y dependiendo de un sitio, los residuos de una secuencia de consenso del subgrupo 1 de cadena kappa se transfirieron a esto.

7)-2-3 Humanización de cadena pesada de 7B4

7)-2-3-1 Cadena pesada tipo h7B4_H1 humanizada

Una cadena pesada h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada quimérica c7B4 mostrada en SEQ ID NO: 42 mediante el reemplazo en la región variable de ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 con glutamina, isoleucina en la posición de aminoácido 2 con valina, histidina

en la posición de aminoácido 3 con glutamina, serina en la posición de aminoácido 17 con treonina, serina en la posición de aminoácido 23 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 25 con serina, lisina en la posición de aminoácido 40 con glutamina, fenilalanina en la posición de aminoácido 41 con prolina, asparagina en la posición de aminoácido 44 con lisina, lisina en la posición de aminoácido 45 con glicina, metionina en la posición de aminoácido 46 con leucina, metionina en la posición de aminoácido 49 con isoleucina, isoleucina en la posición de aminoácido 68 con valina, serina en la posición de aminoácido 69 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 71 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 80 con serina, glutamina en la posición de aminoácido 82 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 84 con serina, treonina en la posición de aminoácido 88 con alanina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 89 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 93 con valina, alanina en la posición de aminoácido 117 con treonina, y serina en la posición de aminoácido 118 con leucina fue designada como “cadena pesada tipo h7B4_H1 humanizada” (también referida como “h7B4_H1”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h7B4_H1 humanizada se describe en SEQ ID NO: 86 (FIG. 95) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 se describe en SEQ ID NO: 85 (FIG. 94) del Listado de Secuencias.

7)-2-3-2 Cadena pesada tipo h7B4_H2 humanizada

Una cadena pesada h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada quimérica c7B4 mostrada en SEQ ID NO: 42 mediante el reemplazo en la región variable de histidina en la posición de aminoácido 3 con glutamina, serina en la posición de aminoácido 17 con treonina, serina en la posición de aminoácido 23 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 25 con serina, lisina en la posición de aminoácido 40 con glutamina, fenilalanina en la posición de aminoácido 41 con prolina, asparagina en la posición de aminoácido 44 con lisina, lisina en la posición de aminoácido 45 con glicina, metionina en la posición de aminoácido 46 con leucina, metionina en la posición de aminoácido 49 con isoleucina, alanina en la posición de aminoácido 50 con glicina, isoleucina en la posición de aminoácido 68 con valina, serina en la posición de aminoácido 69 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 71 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 80 con serina, glutamina en la posición de aminoácido 82 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 84 con serina, treonina en la posición de aminoácido 88 con alanina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 89 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 93 con valina, alanina en la posición de aminoácido 117 con treonina, y serina en la posición de aminoácido 118 con leucina fue designada como “cadena pesada tipo h7B4_H2 humanizada” (también referida como “h7B4_H2”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h7B4_H2 humanizada se describe en SEQ ID NO: 88 (FIG. 97) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88 se describe en SEQ ID NO: 87 (FIG. 96) del Listado de Secuencias.

7)-2-3-3 Cadena pesada tipo h7B4_H3 humanizada

Una cadena pesada h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada quimérica c7B4 mostrada en SEQ ID NO: 42 mediante el reemplazo en la región variable de histidina en la posición de aminoácido 3 con glutamina, serina en la posición de aminoácido 17 con treonina, serina en la posición de aminoácido 23 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 25 con serina, lisina en la posición de aminoácido 40 con glutamina, fenilalanina en la posición de aminoácido 41 con prolina, asparagina en la posición de aminoácido 44 con lisina, lisina en la posición de aminoácido 45 con glicina, metionina en la posición de aminoácido 46 con leucina, metionina en la posición de aminoácido 49 con isoleucina, isoleucina en la posición de aminoácido 68 con valina, serina en la posición de aminoácido 69 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 71 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 80 con serina, glutamina en la posición de aminoácido 82 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 84 con serina, treonina en la posición de aminoácido 88 con alanina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 89 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 93 con valina, alanina en la posición de aminoácido 117 con treonina, y serina en la posición de aminoácido 118 con leucina fue designada como “cadena pesada tipo h7B4_H3 humanizada” (también referida como “h7B4_H3”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h7B4_H3 humanizada se describe en SEQ ID NO: 90 (FIG. 99) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 se describe en SEQ ID NO: 89 (FIG. 98) del Listado de Secuencias.

7)-2-3-4 Cadena pesada tipo h7B4_H5 humanizada

Una cadena pesada h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena pesada quimérica c7B4 mostrada en SEQ ID NO: 42 mediante el reemplazo en la región variable de histidina en la posición de aminoácido 3 con glutamina, serina en la posición de aminoácido 17 con treonina, serina en la posición de aminoácido 23 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 25 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 41 con prolina, metionina en la posición de aminoácido 49 con isoleucina, isoleucina en la posición de aminoácido 68 con valina, serina en la posición de aminoácido 69 con treonina, treonina en la posición de aminoácido 71 con serina, fenilalanina en la posición de aminoácido 80 con serina, glutamina en la posición de aminoácido 82 con lisina, asparagina en la posición de aminoácido 84 con serina, treonina en la posición de aminoácido 88 con alanina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 89 con alanina, treonina en la posición de aminoácido 93 con valina, alanina en la posición de aminoácido 117 con treonina, y serina en la posición de aminoácido 118 con leucina fue designada como “cadena pesada tipo h7B4_H5 humanizada” (también referida como “h7B4_H5”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo h7B4_H5 humanizada se describe en SEQ ID NO: 92 (FIG. 101) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 se describe en SEQ ID NO: 91 (FIG. 100) del Listado de Secuencias.

7)-2-4 Humanización de cadena ligera de 7B4

7)-2-4-1 Cadena ligera tipo h7B4_L1 humanizada

Una cadena ligera h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera quimérica c7B4

mostrada en SEQ ID NO: 38 mediante el reemplazo en la región variable de ácido aspártico en la posición de aminoácido 1 con ácido glutámico, glutamina en la posición de aminoácido 3 con valina, metionina en la posición de aminoácido 4 con leucina, serina en la posición de aminoácido 9 con glicina, fenilalanina en la posición de aminoácido 10 con treonina, alanina en la posición de aminoácido 13 con leucina, valina en la posición de aminoácido 15 con prolina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 40 con prolina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 42 con glutamina, lisina en la posición de aminoácido 45 con arginina, serina en la posición de aminoácido 60 con ácido aspártico, glicina en la posición de aminoácido 77 con arginina, glutamina en la posición de aminoácido 79 con ácido glutámico, valina en la posición de aminoácido 83 con fenilalanina, treonina en la posición de aminoácido 85 con valina, fenilalanina en la posición de aminoácido 87 con tirosina, alanina en la posición de aminoácido 99 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 103 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 105 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h7B4_L1 humanizada” (también referida como “h7B4_L1”).

La secuencia de aminoácidos de the cadena ligera tipo h7B4_L1 humanizada se describe en SEQ ID NO: 82 (FIG. 91) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 se describe en SEQ ID NO: 81 (FIG. 90) del Listado de Secuencias.

7)-2-4-2 cadena ligera tipo h7B4_L2 humanizada

Una cadena ligera h7B4 humanizada diseñada a partir de la cadena ligera química c7B4 mostrada en SEQ ID NO: 38 mediante el reemplazo en la región variable de fenilalanina en la posición de aminoácido 10 con serina, alanina en la posición de aminoácido 13 con leucina, valina en la posición de aminoácido 15 con prolina, valina en la posición de aminoácido 19 con alanina, leucina en la posición de aminoácido 40 con prolina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 42 con glutamina, lisina en la posición de aminoácido 45 con arginina, serina en la posición de aminoácido 60 con ácido aspártico, glicina en la posición de aminoácido 77 con arginina, glutamina en la posición de aminoácido 79 con ácido glutámico, valina en la posición de aminoácido 83 con fenilalanina, treonina en la posición de aminoácido 85 con valina, fenilalanina en la posición de aminoácido 87 con tirosina, alanina en la posición de aminoácido 99 con glutamina, leucina en la posición de aminoácido 103 con valina, y leucina en la posición de aminoácido 105 con isoleucina fue designada como “cadena ligera tipo h7B4_L2 humanizada” (también referida como “h7B4_L2”).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo h7B4_L2 humanizada se describe en SEQ ID NO: 84 (FIG. 93) del Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 se describe en SEQ ID NO: 83 (FIG. 92) del Listado de Secuencias.

Ejemplo 8. Construcción de vectores de expresión para anticuerpos humanizados (h2B1 y h7B4) de anticuerpos GPRC5D anti-humano de rata (2B1 y 7B4) y preparación de anticuerpos

8)-1 Construcción de vector de expresión de cadena pesada h2B1

8)-1-1 Construcción de cadena pesada tipo h2B1_H1

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h2B1_H1 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h2B1_H1

representada por SEQ ID NO: 73 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h2B1_H1 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_H1”.

8)-1-2 Construcción de cadena pesada tipo h2B1_H2

- 5 Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h2B1_H2 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h2B1_H2 representada por SEQ ID NO: 75 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). El fragmento de ADN sintetizado se amplificó mediante PCR y se inserta al sitio de escisión B1pl de enzima de restricción del vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-
10 G1 usando kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión h2B1_H2. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_H2”.

8)-1-3 Construcción de la cadena pesada tipo h2B1_H3

- Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h2B1_H3 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h2B1_H3
15 representada por SEQ ID NO: 77 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h2B1_H3 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_H3”.

8)-1-4 Construcción de cadena pesada tipo h2B1_H4

- Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la región variable
20 h2B1_H4 representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h2B1_H4 representada por SEQ ID NO: 79 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h2B1_H4 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_H4”.

8)-2 Construcción del vector de expresión de cadena ligera h2B1

- 25 8)-2-1 Construcción de cadena ligera tipo h2B1_L1

- Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h2B1_L1 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 61 a 381 de la secuencia de nucleótidos h2B1_L1 representada por SEQ ID NO: 63 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). El fragmento de ADN sintetizado se amplificó mediante PCR y se inserta al sitio de escisión BsiWI de la enzima de restricción
30 del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo humanizado quimérico y humanizado pCMA-LK usando kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión h2B1_L1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_L1”.

8)-2-2 Construcción de cadena ligera tipo h2B1_L2

- Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la región variable
35 h2B1_L2 representada por las posiciones de nucleótido 61 hasta 381 de la secuencia de nucleótidos h2B1_L2 representada por SEQ ID NO: 65 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h2B1_L2 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_L2”.

8)-2-3 Construcción de cadena ligera tipo h2B1_L3

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la región variable h2B1_L3 representada por las posiciones de nucleótido 61 hasta 381 de la secuencia de nucleótidos h2B1_L3 representada por SEQ ID NO: 67 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h2B1_L3 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_L3”.

8)-2-4 Construcción de cadena ligera tipo h2B1_L4

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la región variable h2B1_L4 representada por las posiciones de nucleótido 61 a 381 de la secuencia de nucleótidos h2B1_L4 representada por SEQ ID NO: 69 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h2B1_L4 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_L4”.

8)-2-5 Construcción de cadena ligera tipo h2B1_L5

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h2B1_L5 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 61 a 381 de la secuencia de nucleótidos h2B1_L5 representada por SEQ ID NO: 71 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h2B1_L5 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h2B1_L5”.

8)-3 Construcción del vector de expresión h7B4 de cadena pesada

8)-3-1 Construcción de cadena pesada tipo h7B4_H1

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h7B4_H1 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h7B4_H1 representada por SEQ ID NO: 85 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h7B4_H1 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_H1”.

8)-3-2 Construcción de cadena pesada tipo h7B4_H2

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h7B4_H2 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h7B4_H2 representada por SEQ ID NO: 87 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h7B4_H2 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_H2”.

8)-3-3 Construcción de cadena pesada tipo h7B4_H3

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h7B4_H3 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h7B4_H3 representada por SEQ ID NO: 89 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h7B4_H3 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_H3”.

8)-3-4 Construcción de la cadena pesada tipo h7B4_H5

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h7B4_H5 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 58 a 426 de la secuencia de nucleótidos h7B4_H5 representada por SEQ ID NO: 91 fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión h7B4_H5 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-1-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_H5”.

8)-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera h7B4

8)-4-1 Construcción de cadena ligera tipo h7B4_L1

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la región variable h7B4_L1 representada por las posiciones de nucleótido 61 a 378 de la secuencia de nucleótidos h7B4_L1 representada por SEQ ID NO: 90 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h7B4_L1 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_L1”.

8)-4-2 Construcción de cadena ligera tipo h7B4_L2

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN h7B4_L2 que codifica la región variable representada por las posiciones de nucleótido 61 a 378 de la secuencia de nucleótidos h7B4_L2 representada por SEQ ID NO: 92 fue sintetizado (GeneArt Gene Síntesis Service). Un vector de expresión h7B4_L2 se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 8)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA/h7B4_L2”.

8)-5 Preparación de anticuerpos humanizados (h2B1 y h7B4) (células FreeStyle 293F)

8)-5-1 Producción a pequeña escala de anticuerpos humanizados (h2B1 y h7B4)

Se subcultivaron células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) y se cultivan de acuerdo con el manual.

Se diluyeron 1×10^7 células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico hasta 9.6 mL con Medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.), luego se inoculan a una botella de almacenamiento cuadrada de hasta 30 mL (Nalgene/Thermo Fisher Scientific Inc.), y se cultivan agitando a 90 rpm a 37°C durante 1 hora en una incubadora con CO₂ al 8%. Se disolvió 30 µg de polietilenimina (Polysciences #24765) en 200 µL de Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). A continuación, cada uno del vector de expresión de cadena pesada ((4 µg) y vector de expresión de cadena ligera (6 µg) preparados usando el kit de plásmido PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) se agregaron a 200 µL de Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.). Se agregó 200 µL de la solución mezclada vector de expresión/Opti-Pro SFM a 200 µL de la solución mezclada polietilenimina/Opti-Pro SFM, y la mezcla se agitó suavemente, se deja además durante 5 minutos, y luego se agrega a las células FreeStyle 293F. Las células se cultivaron por agitación a 90 rpm a 37°C durante 7 días en una incubadora con CO₂ al 8%, y el sobrenadante de cultivo obtenido se filtró a través del filtro Minisart-Plus (Sartorius Japan K.K.) y se usó como una muestra para evaluación.

h2B1_H1/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H1 y pCMA/h2B1_L1. h2B1_H1/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H1 y pCMA/h2B1_L2. h2B1_H2/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H2 y pCMA/h2B1_L2. h2B1_H2/L3 se obtuvo por la combinación de

pCMA/h2B1_H2 y pCMA/h2B1_L3. h2B1_H2/L4 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H2 y pCMA/h2B1_L4. h2B1_H2/L5 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H2 y pCMA/h2B1_L5. h2B1_H3/L3 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H3 y pCMA/h2B1_L3. h2B1_H3/L4 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H3 y pCMA/h2B1_L4. h2B1_H3/L5 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H3 y pCMA/h2B1_L5. h2B1_H4/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H4 y pCMA/h2B1_L1. h2B1_H4/L3 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H4 y pCMA/h2B1_L3. h2B1_H4/L4 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H4 y pCMA/h2B1_L4. h2B1_H4/L5 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H4 y pCMA/h2B1_L5. h7B4_H1/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H1 y pCMA/h7B4_L2. h7B4_H2/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H2 y pCMA/h7B4_L2. h7B4_H3/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H3 y pCMA/h7B4_L1. h7B4_H3/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H3 y pCMA/h7B4_L2. h7B4_H5/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H5 y pCMA/h7B4_L1.

8)-5-2 Producción de anticuerpos humanizados (h2B1 y h7B4)

Los anticuerpos humanizados se produjeron de la misma manera como en el Ejemplo 4)-9-1.

Específicamente, h2B1_H1/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H1 y pCMA/h2B1_L1. h2B1_H2/L5 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H2 y pCMA/h2B1_L5. h2B1_H4/L5 se obtuvo por la combinación de pCMA/h2B1_H4 y pCMA/h2B1_L5. h7B4_H1/L2 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H1 y pCMA/h7B4_L2. h7B4_H3/L1 se obtuvo por la combinación de pCMA/h7B4_H3 y pCMA/h7B4_L1.

8)-5-3 Purificación de anticuerpos humanizados (h2B1 y h7B4)

Cada anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 8)-5-2 mediante dos etapas usando cromatografía de afinidad rProtein A (a 4 hasta 6°C) e hidroxiapatita cerámica (a temperatura ambiente). Se llevaron a cabo las etapas de rempalzo de solución amortiguadora después de la purificación por cromatografía de afinidad de rProtein A y después la purificación de hidroxiapatita cerámica a 4 hasta 6°C. El sobrenadante de cultivo se aplicó a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corp., columna HiTrap) equilibrada con PBS. Después de entrar el sobrenadante de cultivo completo en la columna, la columna se lavó con PBS en una cantidad por lo menos dos veces el volumen de la columna. A continuación, las fracciones que contienen anticuerpos se recolectaron por elución con una solución 2 M de clorhidrato de arginina (pH 4.0). Las fracciones se remplazaron en solución amortiguadora con PBS mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific Inc., Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer) y luego se diluyen 5 veces con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 5mM y MES 50 mM (pH 7.0). La solución de anticuerpo resultante se aplicó a una columna de hidroxiapatita cerámica (Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale CHT columna de hidroxiapatita Tipo 1) equilibrada con una solución amortiguadora de NaPi 5 mM, MES 50 mM, y NaCl 30 mM (pH 7.0). Las fracciones que contienen anticuerpos se recolectaron por elución de gradiente en concentración lineal usando cloruro de sodio. Las fracciones se remplazaron en solución amortiguadora con HBSor (histidina 25 mM y sorbitol al 5%, pH 6.0) mediante diálisis (Thermo Fisher Scientific Inc., Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer). Las fracciones se concentraron y se ajustó hasta una concentración IgG de 10

mg/ml o más alta usando Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN 20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius Japan K.K., a 4°C). Finalmente, la solución de anticuerpo se filtró a través del filtro Minisart-Plus (Sartorius Japan K.K.) y se usa como una muestra purificada.

Ejemplo 9. Evaluación de la actividad *in vitro* del anticuerpo humanizado anti-GPRC5D

- 5 9)-1 Evaluación de la actividad de enlace de anticuerpos humanizados anti-GPRC5D (h2B1_H1/L1 a h2B1_H4/L5 y h7B4_H1/L2 a h7B4_H5/L1) contra GPRC5D humano mediante citometría de flujo

Células de la línea celular de mieloma múltiple humano KHM-1B que expresan GPRC5D se ajustaron hasta una concentración de 2×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos, y se
10 centrifugaron para remover el sobrenadante. El sobrenadante de cultivo de cada anticuerpo humanizado anti-GPRC5D obtenido en el Ejemplo 8)-3-1 o anticuerpo de control del isotipo de IgG humano (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 14 ng/mL a 30 µg/mL se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces
15 con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, IgG Anti-Humano de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fcγ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un
20 citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de la MFI del anticuerpo de control se restó del valor de la MFI del anticuerpo GPRC5D para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). La FIG. 102 muestra los resultados acerca de los anticuerpos anti-GPRC5D humanizados h2B1_H1/L1 a h2B1_H4/L5, y la FIG. 103 muestra los resultados acerca de los anticuerpos anti-GPRC5D humanizados
25 h7B4_H1/L2 a h7B4_H5/L1. Como se muestra en las FIG.s 102 y 103, estos anticuerpos humanizados anti-GPRC5D se encontró que se enlazaban a GPRC5D humano.

9)-2 Evaluación de actividad de enlace de anticuerpos humanizados anti-GPRC5D (h2B1_H1/L1 a h2B1_H4/L5 y h7B4_H1/L2 a h7B4_H5/L1) contra GPRC5D de mono cynomolgus mediante citometría de
30 flujo

La tinción y análisis se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 9)-1 usando las células KMS-11_cGPRC5D preparadas en el Ejemplo 5)-2-2. Como se muestra en las FIGS. 201 y 202, estos anticuerpos anti-GPRC5D humanizados se encontró que se enlazaban a GPRC5D de mono cynomolgus.

- 35 9)-3 Evaluación de actividad ADCC de anticuerpos humanizados anti-GPRC5D (h2B1_H1/L1, h2B1_H2/L5, h2B1_H4/L5, h7B4_H1/L2, y h7B4_H3/L1)

Las células KHM-1B preparadas en el Ejemplo 2)-3-1 se agregaron en una cantidad de 50 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos. Cada anticuerpo humanizado anti-GPRC5D (h2B1_H1/L1, h2B1_H2/L5, h2B1_H4/L5, h7B4_H1/L2 y h7B4_H3/L1) o anticuerpo de control

humano (hlgG1) (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 0.15 ng/mL a 15 µg/mL (concentración final) se agregó a ello en una cantidad de 50 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 1)-5-3 se agregaron además a esto en una cantidad de 100 µL/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1200 rpm por 3 minutos, las células se cultivaron a 37°C durante 4 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Una alícuota de 50 µL del sobrenadante se recuperó en LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó durante la noche a 50°C, seguido por medición usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas por actividad ADCC se calculó de acuerdo con Ejemplo 1)-5-5. Como se muestra en la FIG. 104, h2B1_H1/L1, h2B1_H2/L5, h2B1_H4/L5, h7B4_H1/L2, y h7B4_H3/L1 se encontraron que tienen actividad ADCC.

Ejemplo 10. Obtención del anticuerpo anti-GPRC5D derivado de biblioteca de fagos de anticuerpos humanos, y evaluación de la actividad de enlace

10)-1 Aislamiento de scFv que tiene actividad de enlace GPRC5D

Se aisló scFv enlazado a GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus a partir de una biblioteca de fagos de anticuerpos humanos. Se agregaron fagos a estreptavidina Dynabeads M-280 (Thermo Fisher Scientific Inc.) en la cual el péptido amino-terminal (sintetizado por Peptide Institute, Inc.) de humano (SEQ ID NO: 2 del Listado de Secuencias; FIG. 3) o GPRC5D de mono cynomolgus que tiene una terminal carboxi biotinilada se inmovilizó. Los fagos no enlazados se removieron mediante operación de lavado usando un soporte de imán (DynaMag-2, Thermo Fisher Scientific Inc.). El péptido amino-terminal de GPRC5D de mono cynomolgus usado tiene la siguiente secuencia:

Péptido amino-terminal de GPRC5D de mono cynomolgus: MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLEK(Biotina)-NH₂ (SEQ ID NO: 93 del Listado de Secuencias; FIG. 105)

Luego, se infectó *E. coli* (XL-1 Blue, Agilent Technologies, Inc.) por los fagos enlazados con el péptido amino-terminal GPRC5D, y los fagos enlazados con el péptido amino-terminal GPRC5D se recuperaron y amplificaron. Alternativamente, se agregaron los fagos a células Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) lo que causa que expresen de manera transitoria GPRC5D humano o de mono cynomolgus usando el vector de expresión GPRC5D preparado en el Ejemplo 1)-1-1 o 5)-2-1. Los fagos no enlazados se removieron mediante operación de lavado. Luego, se infectó *E. coli* por los fagos enlazados con el péptido amino-terminal GPRC5D, y los fagos enlazados con el péptido amino-terminal GPRC5D se recuperaron y amplificaron. Un total de 3 rondas de inmunoadsorción se llevaron a cabo para el péptido o las células Expi293F lo que causa que expresen de manera transitoria GPRC5D humano o de mono cynomolgus. Después de transferir a partir del fagémido policlonal a un vector de expresión para *E. coli* para agregar etiquetas FLAG y His a la terminación carboxilo de scFv, se transformó *E. coli* con el vector de expresión, y scFv se expresó en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich Corp.) y se somete a cribado por ELISA.

10)-2 Cribado para scFv enlazado a GPRC5D por ELISA

Se agregó NeutrAvidin (Life Technologies Corp.) diluido hasta 1 µg/mL con PBS (solución salina

amortiguada con fosfato 0.01 M (pH 7.4) que contiene cloruro de sodio 0.138 M y cloruro de potasio 0.0027 M, Sigma-Aldrich Corp.) en una cantidad de 50 µL/pocillo a una placa Maxi-sorp de 384 pocillos (Negra, Nunc/Thermo Fisher Scientific Inc.), y la placa se dejó en reposo durante la noche a 4°C por inmovilización. Después de lavar tres veces con PBS que contiene Tween-20 al 0.05% (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (ELISA solución amortiguadora), el péptido amino-terminal del GPRC5D humano o de mono cynomolgus biotinilado (también usado en el Ejemplo 10)-1) diluido hasta 1 µg/mL con PBS se agregó a esto, y la placa se sacudió a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, la placa se bloqueó con caseína de bloqueo (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se lavó tres veces con una solución amortiguadora ELISA. Luego, la solución de cultivo de la *E. coli* que expresa scFv se agregó a la placa y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, un anticuerpo anti-FLAG etiquetado con peroxidasa de raíz de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich Corp.) diluido 5000 veces con una solución amortiguadora ELISA se agregó a ello en una cantidad de 50 µL/pocillo y se hace reaccionar a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar cinco veces con solución amortiguadora ELISA, se agregó sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc.). Después de 10 minutos, se midió la quimioluminiscencia usando un lector de placas (Lector Multietiquetas Envision 2104, PerkinElmer, Inc.), y se seleccionó scFv enlazado a GPRC5D.

10)-3 Formación de secuencias de clon positivo ELISA

Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de clones positivos ELISA (C2037, C3048, C3015, y C3022) se analizaron por método terminador de pigmento (BigDye(R) Terminator v3.1, Thermo Fisher Scientific Inc.). Las secuencias de cebador usadas en el análisis de secuencias fueron como sigue:

Cebador A: 5'-CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGA-3' (SEQ ID NO: 94 del Listado de Secuencias; FIG. 106)

Cebador B: 5'-ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA-3' (SEQ ID NO: 95 del Listado de Secuencias; FIG. 107)

Las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de los genes del anticuerpo C2037, el anticuerpo C3048, el anticuerpo C3015, y el anticuerpo C3022 se determinaron por el análisis.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de C2037 se muestra en SEQ ID NO: 96 (FIG. 108), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 97 (FIG. 109).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de C2037 se muestra en SEQ ID NO: 98 (FIG. 110), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 99 (FIG. 111).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de C3048 se muestra en SEQ ID NO: 100 (FIG. 112), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 101 (FIG. 113).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena

ligera de C3048 se muestra en SEQ ID NO: 102 (FIG. 114), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 103 (FIG. 115).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de C3015 se muestra en SEQ ID NO: 104 (FIG. 116), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 105 (FIG. 117).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de C3015 se muestra en SEQ ID NO: 106 (FIG. 118), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 107 (FIG. 119).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de C3022 se muestra en SEQ ID NO: 108 (FIG. 120), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 109 (FIG. 121).

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de C3022 se muestra en SEQ ID NO: 110 (FIG. 122), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 135 (FIG. 123).

10)-4 Expresión y purificación de scFv

El anticuerpo C2037, anticuerpo C3048, anticuerpo C3015, o anticuerpo C3022 scFv se insertó a un vector de expresión para células animales tal como pADNc3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para construir un vector de expresión scFv para células animales. El vector de expresión scFv para células animales se transfectó a células Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.), para expresión transitoria. Si es necesario, el scFv se purificó a partir del sobrenadante de cultivo usando una columna His Trap (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) y una columna de filtración con gel (Superdex 200 Increase, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). La solución amortiguadora que contiene el scFv disuelto en esto se reemplazó con PBS, y la solución resultante se sometió a la siguiente etapa "10)-6".

10)-5 Conversión a IgG de longitud completa y expresión y purificación de IgG

Una forma de IgG de longitud completa que contiene C2037, C3048, C3015, o C3022 se preparó por el siguiente método.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de cada anticuerpo identificadas en el Ejemplo 10)-3 se enlazaron a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena pesada IgG1 humana (CH1 + región Fc: posiciones en la secuencia de aminoácidos 135 a 464 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 (FIG. 156) del Listado de Secuencias) y una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena ligera IgG₁ humana (CL: posiciones en la secuencia de aminoácidos 131 al 236 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145 (FIG. 157) del Listado de Secuencias), respectivamente, por un método de rutina. Los constructos se insertaron a un vector de expresión para células animales tal como pADNc3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para construir un vector de expresión IgG para células animales.

La secuencia de nucleótidos del vector de expresión IgG construido se volvió a analizar. Se confirmó que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo

C2037 fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 136 (FIG. 148) del Listado de Secuencias, y la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 137 (FIG. 149) del Listado de Secuencias.

5 Se confirmó que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo C3048 fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 138 (FIG. 150) del Listado de Secuencias, y la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 139 (FIG. 151) del Listado de Secuencias.

10 Se confirmó que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo C3015 fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 140 (FIG. 152) del Listado de Secuencias, y la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 141 (FIG. 153) del Listado de Secuencias.

15 Se confirmó que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo C3022 fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 142 (FIG. 154) del Listado de Secuencias, y la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa fue la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 143 (FIG. 155) del Listado de Secuencias.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de longitud completa de los anticuerpos C2037, C3048, C3015, y C3022 codificadas por estas las secuencias se determinaron a partir de las secuencias de nucleótidos.

20 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo C2037 fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 (FIG. 156) del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145 (FIG. 157) del Listado de Secuencias.

25 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo C3048 fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146 (FIG. 158) del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 147 (FIG. 159) del Listado de Secuencias.

30 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo C3015 fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 148 (FIG. 160) del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 149 (FIG. 161) del Listado de Secuencias.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo C3022 fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 150 (FIG. 162) del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera fue la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 151 (FIG. 163) del Listado de Secuencias.

35 La forma IgG del anticuerpo C2037, C3048, C3015, o C3022 se expresó transitoriamente por la transfección de células FreeStyle 293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) con el vector de expresión IgG para células animales. Si es necesario, la forma IgG se purificó usando una columna de afinidad de proteína A (HiTrap Mab Select SuRe, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Luego, la solución amortiguadora que

contiene la IgG disuelta en ella se reemplazó con PBS usando Vivaspín 20 (7k MWCO, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), y la solución resultante se sometió a la siguiente etapas 10)-7-7 y 10)-9.

10)-6 Confirmación de enlace de scFv a GPRC5D por ELISA

Se agregó NeutrAvidin diluido hasta 1 µg/mL con PBS en una cantidad de 50 µL/pocillo a la placa Maxi-sorp de 96 pocillos (Black, Nunc/Thermo Fisher Scientific Inc.), y la placa se dejó en reposo durante la noche a 4°C por inmovilización. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, el péptido amino-terminal de GPRC5D humano o de mono cynomolgus biotinilado (usado en el Ejemplo 10)-1) diluido hasta 1 µg/mL con PBS se agregó a esto, y la placa se sacudió a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, la placa se bloqueó con Blocker Casein y se lavó tres veces con una solución amortiguadora ELISA. Luego, se agregó scFv de C2037, C3048, C3015, o C3022 a la placa y se hace reaccionar a temperatura ambiente por 2 horas. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, un anticuerpo anti-FLAG etiquetado con peroxidasa de raíz de rábano (HRP) diluido 5000 veces con una solución amortiguadora ELISA se agregó a ello en una cantidad de 50 µL/pocillo y se hace reaccionar a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar cinco veces con una solución amortiguadora ELISA, se agregó sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico ELISA. Después de 10 minutos, se midió la quimioluminiscencia usando un lector de placas. Como resultado, los scFvs C2037, C3048, C3015, y C3022 se encontró que se enlazaban a los péptidos amino-terminales de GPRC5D humano (FIG. 164A) y GPRC5D de mono cynomolgus (FIG. 164B).

10)-7 Confirmación de enlace de IgG a GPRC5D por ELISA

Se agregó NeutrAvidin diluida a 1 µg/mL con PBS en una cantidad de 50 µL/pocillo a la placa Maxi-sorp de 96 pocillos, y la placa se dejó en reposo durante la noche a 4°C por inmovilización. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, el péptido amino-terminal del GPRC5D humano o de mono cynomolgus biotinilado (usado en el Ejemplo 10)-1) diluido hasta 1 µg/mL con PBS se agregó a esto, y la placa se sacudió a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, la placa se bloqueó con Blocker Casein y se lavó tres veces con una solución amortiguadora ELISA. Luego, la solución de cultivo de las células FreeStyle 293F que expresan IgG se agregó a la placa y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con una solución amortiguadora ELISA, un anticuerpo Fab anti-humano etiquetado con peroxidasa de raíz de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 2500 veces con solución amortiguadora ELISA se agregó a ello en una cantidad de 50 µL/pocillo y se hace reaccionar a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar cinco veces con una solución amortiguadora ELISA, se agregó sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico ELISA. Después de 10 minutos, se midió la quimioluminiscencia usando un lector de placas. Como resultado, las formas IgG C2037, C3048, C3015 y C3022 se encontró que se enlazaban a los péptidos amino-terminales de GPRC5D humano y GPRC5D de mono cynomolgus (FIG. 165).

10)-8 Enlace de scFv a célula que expresa GPRC5D humano endógeno (KMS-34)

Las células KMS-34 se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con una solución

amortiguadora FACS (PBS que contiene BSA al 0.5% y EDTA 2 mM, pH 7.4), y luego se suspende en la misma solución como anteriormente. Se agregó scFv C2037, C3048, C3015 o C3022 a la suspensión celular obtenida, y la mezcla se dejó en reposo a 4°C durante 2 horas. Después de lavar dos veces con una solución amortiguadora FACS, las células se suspendieron mediante la adición de un anticuerpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich Corp.), y la mezcla se dejó de manera adicional en reposo a 4°C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con una solución amortiguadora FACS, las células se suspendieron mediante la adición de anticuerpo IgG anti-ratón etiquetado con Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), y la mezcla se dejó de manera adicional en reposo a 4°C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con una solución amortiguadora FACS, las células se fijaron en PFA al 1% (preparado a partir de una solución de paraformaldehído al 32% (Electron Microscopy Sciences)), seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.).

Como resultado, los scFvs de C2037, C3048, C3015, y C3022 se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D humano (FIG. 166).

10)-9 Enlace de IgG a célula endógena que expresa GPRC5D humano (KHM-1B)

Células de línea celular de mieloma múltiple humano KHM-1B que expresan GPRC5D se ajustaron hasta una concentración de 2×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 μ L/pocillo hacia una microplaca en forma de "U" con 96 pocillos, y se centrifugaron para retirar el sobrenadante. El sobrenadante de cultivo de cada uno del anticuerpo anti-GPRC5D humano (forma IgG de longitud completa que contiene C2037, C3048, C3015, o C3022) obtenido en el Ejemplo 10)-5 o anticuerpo de control del isotipo de IgG humano (Calbiochem/Merck Millipore Corp.) ajustado hasta 14 ng/mL a 30 μ g/mL se agregó a ello en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, IgG Anti-Humano de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.). La intensidad de fluorescencia PE de la fracción celular se trazó en un histograma, y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de la MFI del anticuerpo de control se restó del valor de la MFI del anticuerpo GPRC5D para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como resultado, las formas IgG C2037, C3048, C3015, y C3022 se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D humano (FIG. 167).

10)-10 Preparación y evaluación de forma modificadas de C3022 y C3048

10)-10-1 Obtención de formas modificadas

Se construyó una biblioteca por el uso de un método para introducir una mutación por PCR usando los genes C3022 y C3048 como plantillas (Zaccolo, et al., J. Mol. Biol. (1996) 255, 589-603) o un

método el cual involucra sintetizar oligómeros de tal manera que como todos los residuos de CDRs, cada uno de los residuos se mutó a 19 tipos de aminoácidos diferentes a aminoácidos de tipo natural para construir una biblioteca (biblioteca basada en oligo). La biblioteca se cribó para clones que tienen la alta capacidad de enlazarse, y se determinaron sus secuencias de nucleótidos. Las mutaciones de alto enlace indentificadas se combinaron para obtener un mutante de alto enlace E1018 de C3022 y un mutante de alto enlace D1012 de C3048.

La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada del E1018 obtenido se muestra en SEQ ID NO: 190 (FIG. 213), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 191 (FIG. 214).

La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera del E1018 obtenido se muestra en SEQ ID NO: 192 (FIG. 215), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 193 (FIG. 216).

La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada del D1012 obtenido se muestra en SEQ ID NO: 194 (FIG. 217), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 195 (FIG. 218).

La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera del D1012 obtenido se muestra en SEQ ID NO: 196 (FIG. 219), y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 197 (FIG. 220).

10)-10-2 Confirmación de enlace a GPRC5D usando Biacore

La actividad de enlace de los anticuerpos anti-GPRC5D contra el péptido amino-terminal de GPRC5D humano se probó por SPR usando Biacore T200. El péptido amino-terminal del GPRC5D humano biotinilado diluido hasta 2 nM con HBS-EP+ (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) se inmovilizó en un Sensor Chip CAP (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) por contacto a una relación de 10 μ L/min por 180 segundos. Luego, se calculó el Kd por análisis cinético usando una pluralidad de concentraciones de cada uno de scFv diluido con HBS-EP+ como analitos. Como resultado, los scFvs E1018 y D1012 se encontró que se enlazaban al péptido amino-terminal de GPRC5D humano más fuertemente que C3022 y C3048, respectivamente (FIG. 221).

Ejemplo 11. Construcción del vector de expresión del anticuerpo anti-CD3

11)-1 Construcción de vector de expresión del anticuerpo anti-CD3 scFv de rata

Un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti-CD3 de rata se preparó a partir de ganglios linfáticos o bazo de una rata inmunizada por el método de inmunización de ADN. Los ADNcs que codifican VH y VL del anticuerpo monoclonal se formaron en secuencias a partir del hibridoma, y se preparó un vector de expresión Fv de cadena sencilla. Específicamente, el fragmento de ADN VH de SEQ ID NO: 152 (FIG. 168) amplificado por PCR, el fragmento de ADN del enlazador a insertarse entre VH y VL, y un fragmento de ADN amplificado por PCR en el cual una secuencia de ADN que codifica una etiqueta FLAG-His se agregó a una región que contiene la secuencia VL de ADN de SEQ ID NO: 153 (FIG. 169) de tal manera que la etiqueta FLAG-His se localizó en la terminación carboxilo, se fusionaron usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de

expresión Fv de cadena sencilla pC3E-7000 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 154 (FIG. 170) en ORF.

11)-2 Construcción de vector de expresión del anticuerpo anti-CD3 scFv humanizado pC3E-7034

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene una región que contiene una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 156 (FIG. 172)) conectada a la terminación carboxilo de SEQ ID NO: 155 (FIG. 171) por medio de un enlazador flexible de 15 aminoácidos, y secuencias adicionales de 15 bases corriente arriba y corriente abajo del mismo fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Una región que contiene el ADN C3E-7034 y sus secuencias adicionales corriente arriba y corriente abajo se amplificó mediante PCR usando este fragmento de ADN como una plantilla para obtener un inserto fragmento de ADN. Una región de vector excepto para una región scFv se amplificó mediante PCR usando el vector de expresión pC3E-7000 preparado en el Ejemplo 11)-1 como una plantilla para obtener un fragmento vector. Estos fragmentos de ADN se fusionaron usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 157 (FIG. 173) en ORF. El vector de expresión obtenido se designó como "pC3E-7034".

11)-3 Construcción de vector de expresión del anticuerpo anti-CD3 scFv humanizado pC3E-7035

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 158 (FIG. 174) conectada a la terminación carboxilo de SEQ ID NO: 155 (FIG. 171) por medio de un enlazador flexible de 17 aminoácidos, y secuencias adicionales de 15 bases corriente arriba y corriente abajo del mismo fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 159 (FIG. 175) en ORF se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 11)-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pC3E-7035".

11)-4 Construcción de vector de expresión del anticuerpo anti-CD3 scFv humanizado pC3E-7036

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 160 (FIG. 176) conectada a la terminación carboxilo de SEQ ID NO: 155 (FIG. 171) por medio de un enlazador flexible de 15 aminoácidos, y secuencias adicionales de 15 bases corriente arriba y corriente abajo del mismo fue sintetizado (GeneArt Artificial Gene Synthesis Service). Un vector de expresión C3E-7036 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 161 (FIG. 177) en ORF se construyó de la misma manera como en el Ejemplo 11)-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pC3E-7036".

Ejemplo 12. Preparación de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3

12)-1 Preparación del vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3

Una secuencia de ADN de una región que contiene el anticuerpo C2037 scFv, una porción de una secuencia de señal de anticuerpo humano de cadena pesada, y un enlazador agregado para enlazar scFvs se amplificó mediante PCR usando la secuencia de ADN del anticuerpo C2037 scFv preparado en el Ejemplo 10)-4 como una plantilla para obtener un ADN de inserto. También, la región de vector completa que contiene el ADN anti-CD3 scFv se amplificó mediante PCR usando el vector de expresión

pC3E-7034 preparado en el Ejemplo 11)-2 como una plantilla y cebadores que codifican una secuencia señal y la secuencia amino-terminal del anticuerpo anti-CD3 scFv para obtener un fragmento vector. Estos fragmentos de ADN se fusionaron usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que
 5 contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 162 (FIG. 178) en ORF. El vector de expresión obtenido se designó como “pC2037-C3E7034”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 163 (FIG. 179) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3048 scFv y pC3E-7034 como plantillas. El
 10 vector de expresión obtenido se designó como “pC3048-C3E7034”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 164 (FIG. 180) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3022 scFv y pC3E-7034 como plantillas. El
 vector de expresión obtenido se designó como “pC3022-C3E7034”.

15 Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 165 (FIG. 181) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C2037 scFv y pC3E-7035 como plantillas. El vector de expresión obtenido se designó como “pC2037-C3E7035”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la
 20 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 166 (FIG. 182) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3048 scFv y pC3E-7035 como plantillas. El vector de expresión obtenido se designó como “pC3048-C3E7035”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la
 25 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 167 (FIG. 183) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3022 scFv y pC3E-7035 como plantillas. El vector de expresión obtenido se designó como “pC3022-C3E7035”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la
 30 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 168 (FIG. 184) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C2037 scFv y pC3E-7036 como plantillas. El vector de expresión obtenido se designó como “pC2037-C3E7036”.

Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la
 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 169 (FIG. 185) en ORF se construyó de la misma manera como
 anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3048 scFv y pC3E-7036 como plantillas. El
 vector de expresión obtenido se designó como “pC3048-C3E7036”.

35 Un vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 170 (FIG. 186) en ORF se construyó de la misma manera como anteriormente usando la secuencia de ADN del anticuerpo C3022 scFv y pC3E-7036 como plantillas. El vector de expresión obtenido se designó como “pC3022-C3E7036”.

12)-2 Expresión y purificación de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3

Se expresaron C2037-C3E7034 a C3022-C3E7036 y purificaron de la misma manera como en el Ejemplo 10)-4. La secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7034 se describe en SEQ ID NO: 171 (FIG. 187). La secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7034 se describe en SEQ ID NO: 172 (FIG. 188). La secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7034 se describe en SEQ ID NO: 173 (FIG. 189). La secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7035 se describe en SEQ ID NO: 174 (FIG. 190). La secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7035 se describe en SEQ ID NO: 175 (FIG. 191). La secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7035 se describe en SEQ ID NO: 176 (FIG. 192). La secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7036 se describe en SEQ ID NO: 177 (FIG. 193). La secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7036 se describe en SEQ ID NO: 178 (FIG. 194). La secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7036 se describe en SEQ ID NO: 179 (FIG. 195).

Ejemplo 13. Evaluación de la actividad in vitro de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3

13)-1 Evaluación de la actividad de enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 mediante citometría de flujo

13)-1-1 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 a la célula que expresa GPRC5D humano endógeno (A4/Fuk)

Las células A4/Fuk de línea celular de linfoma (JCRB Cell Bank) se ajustaron hasta una concentración apropiada con PBS que contiene FBS al 5%. Se agregó el kit de tinción LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell a las células, que se dejaron entonces en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 μ L/pocillo hacia una microplaca en forma de "U" con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada una de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 (C2037-C3E7034 ao C3022-C3E7036 preparados en el Ejemplo 12) diluidas con PBS que contiene FBS al 5% se agregaron a esto en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, se agregó Penta-His Alexa Fluor 488 diluido con PBS que contiene FBS al 5% a ello en una cantidad de 30 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II). Los datos fueron analizados usando Flowjo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas se calculó. El valor de la MFI de la muestra no complementada con anticuerpo se restó del valor de la MFI de la muestra complementada con anticuerpo para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como se muestra en la FIG. 196, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D humano endógeno.

13)-1-2 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 to células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus

La tinción y análisis se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 13)-1-1 usando

las células KMS-11_cGPC5D preparadas en el Ejemplo 5)-2-2. Como se muestra en la FIG. 197, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontraron que se enlazaban a células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus.

13)-1-3 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 a CD3 humana (PBMC)

5 Se ajustó PBMC humano comercialmente disponible (Cellular Technology Limited) hasta una concentración apropiada con PBS que contiene FBS al 5%. Se agregaron el kit de tinción LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell (Thermo Fisher Scientific Inc.) y un anticuerpo anti-CD19 (Beckman Coulter Inc.) a las células, las cuales se dejaron entonces en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de "U" con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada una de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 (C2037-C3E7034 a C3022-C3E7036 preparadas en el Ejemplo 12) diluidas con PBS que contiene FBS al 5% se agregaron a esto en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, se agregó Penta-His Alexa Fluor 488 (Qiagen N.V.) diluido con PBS que contiene FBS al 5% a ello en una cantidad de 30 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson and Company). Los datos fueron analizados usando Flowjo (Tree Star, Inc.). Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas y células positivas CD19. El valor de la MFI de la muestra no complementada con anticuerpo se restó del valor de la MFI de la muestra complementada con anticuerpo para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como se muestra en la FIG. 198, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontraron que se enlazaban a células que expresan CD3 humana.

13)-1-4 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 a CD3 de mono cynomolgus (PBMC)

Se recolectó PBMC de la sangre de un mono cynomolgus de acuerdo con un método regular usando SepMate (StemCell Technologies Inc.) y solución de separación de linfocitos (Nacalai Inc.). Usando el PBMC de mono cynomolgus recolectado, se llevaron a cabo la tinción y análisis de la misma manera como en el Ejemplo 13)-1-3. Como se muestra en la FIG. 199, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontraron que se enlazaban a células que expresan CD3 de mono cynomolgus.

13)-2 Evaluación de actividad citotóxica de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3

13)-2-1 Preparación de célula blanco

35 Se ajustaron células A4/Fuk a una concentración de 1×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contiene FBS al 10%. Se agregó 100 µL de Radionúclido de Cromo 51 (PerkinElmer, Inc.) por mL de la suspensión celular, y las células se cultivaron a 37°C durante 2 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Las células se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 que contiene

FBS al 10%, luego se vuelven a suspender a 1×10^5 células/mL en un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10%, y se usan como células blanco.

13)-2-2 Preparación de la célula efectora

Se descongeló PBMC congelado comercialmente disponible (Cellular Technology Limited) a 37°C, se transfiere a una solución de un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% complementado con reactivo de lavado Anti-agregado (Cellular Technology Limited), se lavó dos veces, luego se ajustó a 1×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10%, y se usan como células efectoras.

13)-2-3 Ensayo de citotoxicidad

Las células A4/Fuk obtenidas en el Ejemplo 13)-2-1 se agregaron a una concentración de 50 μ L/pocillo a una microplaca en forma de "U" con 96 pocillos. Cada una de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 (preparada en el Ejemplo 12) ajustada hasta concentraciones variantes se agregó a ello en una cantidad de 50 μ L/pocillo. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 13)-2-2 se agregaron a esto en una cantidad de 100 μ L/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1000 rpm por 1 minuto, las células se cultivaron a 37°C durante 20 hasta 24 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Una alícuota de 50 μ L del sobrenadante se recuperó en LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se seca a 50°C durante aproximadamente 2 horas, seguido por medición usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A: Conteo de pocillo de muestra

B: Conteos promedio de respaldo (pocillos no complementados con anticuerpo) (n = 3). Se agregó 50 μ L de un medio para ensayo en lugar de agregar el anticuerpo. Los otros procedimientos fueron los mismos como en el caso del pocillo de muestra.

C: Conteos de promedio de liberación máxima (pocillos que contienen células blanco lisadas en un tensoactivo) (n = 3). Se agregó 50 μ L de un medio para ensayo en lugar de agregar el anticuerpo. Se agregó 100 μ L del tensoactivo, y se transfirió la alícuota de 50 μ L a LumaPlate, como con el pocillo de muestra, y se evalúa.

Como se muestra en la FIG. 200, estos anticuerpos anti GPRC5D-anti-CD3 biespecíficos exhiben actividad citotóxica contra las células A4/Fuk.

Ejemplo 14. Preparación de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

14)-1 Preparación del vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

14)-1-1 Preparación del vector de expresión de molécula biespecífica de tipo anticuerpo de tamaño completo (FSA)

El ADN que codifica la región variable de cadena pesada de tipo H2 del anticuerpo anti-GPRC5D humanizado (h2B1) construida en el Ejemplo 8)-1-2 se sintetizó en red artificialmente (Servicio de Síntesis Génica a la Medida Genscript). Los vectores de expresión "pCL_#13540" y "pCL_#13543" fueron preparados por inserción de ADNs que codifican la región variable de cadena pesada obtenida, dos tipos

de regiones CH1 derivadas de IgG humana, y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros (WO2014/190441) al vector de expresión de mamífero pTT5 (National Research Council, WO2009/137911). También, el ADN que codifica la región variable de cadena ligera del tipo L5 del anticuerpo anti-GPRC5D humanizado (h2B1) construida en el Ejemplo 8)-2-5 se sintetizó en red artificialmente. Los vectores de expresión “pCL_#12290” y “pCL_#12313” fueron preparados por inserción de ADNs que codifican la región variable de cadena ligera obtenida y dos tipos de regiones CL derivadas de IgG humana al vector de expresión de mamífero pTT5.

A continuación, un fragmento de ADN que codifica la cadena pesada del scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034) construido en el Ejemplo 11)-2 se sintetizó en red artificialmente. “pCL_#13552” se preparó por inserción de ADNs que codifican la región variable de cadena pesada de scFv obtenida, CH1 derivada de IgG humana, y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros al vector de expresión de mamífero pTT5. También, un fragmento de ADN que codifica la cadena ligera del scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034) construido en el Ejemplo 11)-2 se sintetizó en red artificialmente. “pCL_#12287” se preparó por inserción de ADNs que codifican la región variable de cadena ligera de scFv obtenida y CL derivada de IgG humana al vector de expresión de mamífero pTT5. De la misma manera, un fragmento de ADN que codifica la cadena pesada del scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7036) construido en el Ejemplo 11)-4 se sintetizó en red. “pCL_#13541” se preparó al insertar las secuencias de ADN que codifican la región variable de cadena pesada de scFv obtenida, CH1 derivada de IgG humana, y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros al vector de expresión de mamífero pTT5. También, un fragmento de ADN que codifica la cadena ligera del scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7036) construida en el Ejemplo 11)-4 se sintetizó en red. “pCL_#12321” se preparó por inserción de fragmentos de ADN que codifican la cadena ligera de scFv obtenida y CL derivada de IgG humana al vector de expresión de mamífero pTT5.

Las secuencias ORF de pCL_#13540, pCL_#13543, pCL_#12290, pCL_#12313, pCL_#13552, pCL_#12287, pCL_#13541, y pCL_#12321 se muestran en SEQ ID NO: 198 (FIG. 222), SEQ ID NO: 200 (FIG. 224), SEQ ID NO: 202 (FIG. 226), SEQ ID NO: 204 (FIG. 228), SEQ ID NO: 206 (FIG. 230), SEQ ID NO: 208 (FIG. 232), SEQ ID NO: 210 (FIG. 234), y SEQ ID NO: 212 (FIG. 236), respectivamente, del Listado de Secuencias.

14)-1-2 Preparación de los vectores de expresión de molécula biespecífica de tipo híbrido.

Un vector de expresión para células mamíferas que tiene un inserto de fragmentos de ADN que codifica la región variable de cadena pesada de tipo H2 del anticuerpo anti-GPRC5D humanizado (h2B1), una región CH1 derivada de IgG humana, y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros se preparó y se designó como “pCL_#13555”. También, un vector de expresión para células mamíferas que tiene un inserto de fragmentos de ADN que codifica la región variable de cadena ligera de tipo L5 del anticuerpo anti-GPRC5D humanizado (h2B1) y una región CL derivada de IgG humana fueron preparados y se designó como “pCL_#12123”.

A continuación, un vector de expresión para células mamíferas que tiene un inserto de

fragmentos de ADN que codifica el scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034) y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros se preparó y se designó como “pCL_#13557”. También, un vector de expresión “pCL_#13561” para células mamíferas que tiene un inserto de fragmentos de ADN que codifica el scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7036) y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros se preparó.

Las secuencias ORF de pCL_#13555, pCL_#12123, pCL_#13557, y pCL_#13561 se muestran en SEQ ID NO: 214 (FIG. 238), SEQ ID NO: 216 (FIG. 240), SEQ ID NO: 218 (FIG. 242), y SEQ ID NO: 220 (FIG. 244), respectivamente, del Listado de Secuencias.

14)-1-3 Preparación de vectores de expresión de molécula biespecífica de tipo doble

La región variable de cadena pesada de tipo H2 y la región variable de cadena ligera de tipo L5 del anticuerpo anti-GPRC5D humanizado (h2B1) y construidas en el Ejemplo 8)-1-2 se enlazaron por medio de un enlazador flexible que consiste en 3 secuencias de repetición de GGGS para preparar un anticuerpo de cadena sencilla (scFv). “pCL_#13563” se preparó por inserción de fragmentos de ADN que codifican este scFv anti-GPRC5D y una región Fc con funciones de efector reducidas y que contiene mutaciones formadoras de heteromultímeros al vector de expresión de mamífero pTT5. La secuencia ORF de pCL_#13563 se muestra en SEQ ID NO: 222 (FIG. 246) del Listado de Secuencias.

14)-2 Producción de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

Células CHO-3E7 se subcultivaron y se cultivaron de acuerdo con el manual del proveedor (National Research Council Canada, Raymond C. et al., Methods (2011) 55 (1), 44-51). Un cultivo en suspensión de células CHO-3E7 en la fase de crecimiento logarítmico fue diluido hasta 2×10^6 células/mL con un medio F17 FreeStyle (Invitrogen Corp.) que contiene glutamina 4 mM y Kolliphor 0.1% (Sigma-Aldrich Corp.) y se usó en la producción de diversos anticuerpos biespecíficos.

14)-2-1 Producción de molécula biespecífica de tipo anticuerpo de tamaño completo (FSA)

8000 µg de Polietilenimina max (PEImax, Polysciences) se disolvió en medio F17 FreeStyle para preparar una solución PEImax. 1000 µg de una mezcla de los vectores pCL_#13552, pCL_#12287, pCL_#13540, y pCL_#12290 mezclados a una relación de 15:15:53:17, o los vectores pCL_#13541, pCL_#12321, pCL_#13543, y pCL_#12313 mezclados a una relación de 22:8:17:53, se agregó a una alícuota de medio F17, y 1000 µg de una mezcla de ADN de pAKT y pGFP (ambos del National Research Council) mezclados con ADN de esperma de salmón ya fragmentado (Sigma-Aldrich Corp.) se agregó a otra alícuota de medio F17. La solución PEImax, la mezcla de vectores, y la solución de ADN se combinaron, se agitaron suavemente, se incubaron durante 5 minutos, y luego se agrega a 2 L de suspensión celular CHO-3E7. Las células se cultivaron por agitación a 37°C durante 1 día en una incubadora de CO₂ al 5%. Luego se agregaron ácido valproico 0.5 mM (Sigma-Aldrich Corp.) y Tryptone N1 al 0.1% (p/v) (Organotechnie). Las células se cultivaron además por agitación a 32°C durante 6 días. En el día 7 después del inicio del cultivo, el sobrenadante de cultivo se recuperó y se filtró a través de un filtro de 0.2 µm (Sartorius Japan K.K.) para preparar una muestra para evaluación.

pCL_#13552, pCL_#12287, pCL_#13540, y pCL_#12290 se usaron en la expresión y preparación

de una molécula biespecífica tipo FSA de C3E-7034 y h2B1 (v19159). pCL_#13541, pCL_#12321, pCL_#13543, y pCL_#12313 se usaron en la expresión y preparación de una molécula biespecífica de tipo FSA de C3E-7036 y h2B1 (v19140).

Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19159 obtenidas mediante expresión a partir de los vectores respectivos se muestran en SEQ ID NOs: 207 (FIG. 231), 209 (FIG. 233), 199 (FIG. 223), y 203 (FIG. 227) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19140 se muestran en SEQ ID NOs: 211 (FIG. 235), 213 (FIG. 237), 201 (FIG. 225), y 205 (FIG. 229) del Listado de Secuencias.

14)-2-2 Producción de la molécula biespecífica de tipo híbrido

8000 µg de Polietilenimina max (PEImax, Polysciences) se disolvió en medio F17 FreeStyle para preparar una solución PEImax. 1000 µg de una mezcla de los vectores pCL_#13557, pCL_#13555, y pCL_#12123 mezclados a una relación de 1:1:1.5, o los vectores pCL_#13561, pCL_#13555, y pCL_#12123 mezclados a una relación de 1:1:1.5, se agregó a una alícuota de medio F17, y 1000 µg de una mezcla de ADN de pAKT y pGFP (ambos del National Research Council) mezclados con ADN de esperma de salmón ya fragmentado (Sigma-Aldrich Corp.) se agregó a otra alícuota de medio F17. La solución PEImax, la mezcla de vectores, y la solución de pAKT/pGFP/ADN de esperma de salmón se combinaron, se agitaron suavemente, se incubaron durante 5 minutos, y luego se agrega a 2 L de suspensión celular CHO-3E7. Las células se cultivaron por agitación a 37°C durante 1 día en una incubadora con CO₂ al 5%. Luego se agregaron ácido valproico 0.5 mM (Sigma-Aldrich Corp.) y Tryptone N1 al 0.1% (p/v) (Organotechnie). Las células se cultivaron además por agitación a 32°C durante 6 días. En el día 7 después del inicio del cultivo, el sobrenadante de cultivo se recuperó y se filtró a través de un filtro de 0.2 µm (Sartorius Japan K.K.) para preparar una muestra para evaluación.

pCL_#13557, pCL_#13555, y pCL_#12123 se usaron en la expresión y preparación de una molécula biespecífica tipo híbrido de C3E-7034 y h2B1 (v19126). pCL_#13561, pCL_#13555, y pCL_#12123 se usaron en la expresión y preparación de una molécula biespecífica tipo híbrido de C3E-7036 y h2B1 (v19125).

Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19126 obtenidas mediante expresión a partir de los vectores respectivos se muestran en SEQ ID NOs: 219 (FIG. 243), 215 (FIG. 239), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19125 se muestran en SEQ ID NOs: 221 (FIG. 245), 215 (FIG. 239), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias.

14)-2-3 Producción de una molécula biespecífica tipo doble

8000 µg de Polietilenimina max (PEImax, Polysciences) se disolvieron en medio F17 FreeStyle para preparar una solución PEImax. 1000 µg de una mezcla de los vectores pCL_#13557 y pCL_#13563 mezclados a una relación de 4:3, o los vectores pCL_#13561 y pCL_#13563 mezclados a una relación de 1:1, se agregó a una alícuota de medio F17, y 1000 µg de una mezcla de ADN de pAKT y pGFP (ambos del National Research Council) mezclados con ADN de esperma de salmón ya fragmentado (Sigma-Aldrich Corp.) se agregaron a otra alícuota de medio F17. La solución PEImax, la mezcla de vectores, y la solución de pAKT/pGFP/ADN de esperma de salmón se combinaron, se agitaron suavemente, se

incubaron durante 5 minutos, y luego se agregaron a 2 L de suspensión celular CHO-3E7. Las células se cultivaron por agitación a 37°C durante 1 día en una incubadora de CO₂ al 5%. Luego se agregaron ácido valproico 0.5 mM (Sigma-Aldrich Corp.) y Tryptone N1 al 0.1% (p/v) (Organotechnie). Las células se cultivaron además por agitación a 32°C durante 6 días. En el día 7 después del inicio del cultivo, el sobrenadante de cultivo se recuperó y se filtró a través de un filtro de 0.2 µm (Sartorius Japan K.K.) para preparar una muestra para evaluación.

pCL_#13557 y pCL_#13563 se usaron en la expresión y preparación de una molécula biespecífica tipo doble-doble-scFv de C3E-7034 y h2B1 (v19122). pCL_#13561 y pCL_#13563 se usaron en la expresión y preparación de una molécula biespecífica tipo doble de C3E-7036 y h2B1 (v19121).

Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19122 obtenidas mediante expresión a partir de los vectores respectivos se muestran en SEQ ID NOs: 219 (FIG. 243) y 223 (FIG. 247) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen v19121 se muestran en SEQ ID NOs: 221 (FIG. 245) y 223 (FIG. 247) del Listado de Secuencias.

14)-3 Purificación de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

Cada molécula biespecífica se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 14)-2 mediante dos etapas usando cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía por filtración con gel.

El sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS (pH 7.4) para adsorber la molécula biespecífica de interés sobre ella. Los componentes no adsorbidos se removieron con PBS. Luego, el componente adsorbido se eluyó con una solución amortiguadora de acetato (pH 3.6). Las fracciones eluidas se ajustaron hasta pH neutro con una solución amortiguadora Tris (pH 11), luego se concentraron y aplicaron a una columna de filtración con gel (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada por adelantado con PBS (pH 7.4). Las fracciones pico obtenidas por cromatografía de filtración con gel se analizaron por electroforesis capilar SDS (LabChip-Caliper) para recuperar las fracciones correspondientes al heterodímero de interés. Las fracciones finales recuperadas se pasaron a través de un filtro de 0.2 micras para preparar una muestra purificada estéril. Para las preparaciones de molécula biespecífica doble del tipo scFv, las fracciones recuperadas se intercambiaron posteriormente con solución amortiguadora dentro de HBSor (histidina 25 mM, 5% sorbitol, pH 6.0) usando resina de desalado fino G25 en dos columnas en tándem HiPrep 26/10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). La identidad de la muestra purificada se confirmó por espectrometría de masas y electroforesis con SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) para ser la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 correctamente ensamblada de interés.

Ejemplo 15. Evaluación de la actividad *in vitro* de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

15)-1 Evaluación de actividad de enlace de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc mediante citometría de flujo

15)-1-1 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc a las células que expresan GPRC5D humano endógeno (KHM-1B)

Una línea celular de mieloma múltiple humano KHM-1B que expresa GPRC5D se ajustó hasta una concentración apropiada con PBS que contiene FBS al 5%. El kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Near-IR se agregó a las células, las cuales luego se dejaron reposando a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc (preparada en el Ejemplo 14) diluida con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó reposando a 4°C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, La IgG Anti-Humana de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó reposando a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II). Los datos fueron analizados usando Flowjo. La intensidad de fluorescencia PE de la fracción libre a partir de células muertas se trazó en un histograma. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó. Como resultado, los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 que contienen Fc se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D humano (FIGS. 248A-248C).

15)-1-2 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc a células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus

La tinción y análisis se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-1 usando las células KMS-11_cGPRC5D preparadas en el Ejemplo 5)-2-2. Como se muestra en las FIGS. 249A-249C, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 que contienen Fc se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus.

15)-1-3 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc a CD3 humana (PBMC humanas)

PBMC humanas comercialmente disponibles (Cellular Technology Limited) se ajustaron hasta una concentración apropiada con PBS que contiene FBS al 5%. El kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Near-I (Thermo Fisher Scientific Inc.) y un anticuerpo anti-CD19 (Beckman Coulter Inc.) se agregó a las células, las cuales luego se dejaron reposando a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contiene FBS al 5%, se inocularon en una cantidad de 100 µL/pocillo hacia una microplaca en forma de “U” con 96 pocillos, y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc (preparada en el Ejemplo 14) diluida con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 µL/pocillo, y la placa se dejó reposando a 4°C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%. Luego, IgG Anti-Humana de Cabra de Fragmento F(ab')₂ AffiniPure de R-

Ficoeritrina, Específico de Fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene FBS al 5% se agregó a ello en una cantidad de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó reposando a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contiene FBS al 5%, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II). Los datos fueron analizados usando Flowjo. La intensidad de fluorescencia PE de la fracción libre a partir de células muertas se trazó en un histograma. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó. Como resultado, los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 que contienen Fc se encontró que se enlazaban a células que expresan CD3 humana (FIGS. 250A-250C).

15)-1-4 Enlace de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc a CD3 de mono cynomolgus (PBMC de mono cynomolgus)

La tinción y análisis se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-3 usando las PBMC de mono cynomolgus recolectadas de la misma manera como en el Ejemplo 13)-1-4. Como se muestra en las FIGS. 251A-251C, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 que contienen Fc se encontró que se enlazaban a células que expresan CD3 de mono cynomolgus.

15)-2 Evaluación de actividad citotóxica de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

15)-2-1 Preparación de células objetivo

Células KHM-1B se prepararon de la misma manera como en el Ejemplo 13)-2-1 y se usaron como células objetivo.

15)-2-2 Preparación de la célula efectora

PBMC congeladas comercialmente disponibles (Cellular Technology Limited) se derritieron a 37°C, se transfirieron a una solución de un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% complementado con reactivo de lavado anti-agregado (Cellular Technology Limited), se lavó dos veces, luego se ajustó a 1.5×10^5 células/mL con un medio RPMI1640 que contiene FBS al 10%, y usadas como células efectoras.

15)-2-3 Ensayo de Citotoxicidad

Las células KHM-1B obtenidas en el Ejemplo 15)-2-1 se agregaron a una concentración de 50 μ L/pocillo hacia una microplaca en forma de "U" con 96 pocillos. Cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc (preparada en el Ejemplo 14) ajustada hasta concentraciones variantes se agregó a ello en una cantidad de 50 μ L/pocillo. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 15)-2-2 se agregaron a esto en una cantidad de 100 μ L/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1000 rpm por 1 minuto, las células se cultivaron a 37°C durante 24 o 48 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. Una alícuota de 50 μ L del sobrenadante se recuperó en LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó a 50°C durante aproximadamente 2 horas, seguido por medición usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A: Conteo de pocillo de muestra

B: Promedio de conteos de fondo (pocillos no suplementados con anticuerpos) ($n = 3$). 50 μ L de un medio para ensayo se agregó en lugar de agregar el anticuerpo. Los otros procedimientos fueron iguales como en el caso del pocillo de muestra.

- 5 C: Promedio de conteos de liberación máxima (pocillos que contienen células blanco lisadas en un tensoactivo) ($n = 3$). 50 μ L de un medio para ensayo se agregaron en lugar de agregar el anticuerpo. Se agregaron 100 μ L del tensoactivo y la alícuota de 50 μ L se transfirió a LumaPlate, como con el pocillo de muestra, y fue ensayada.

10 Como se muestra en las FIGS. 252A-252C, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 que contienen Fc mostraron actividad citotóxica contra las células KHM-1B.

Ejemplo 16. Evaluación de actividad *in vivo* de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 que contiene Fc

16)-1 Actividad *in vivo* en modelo de co-injerto tumor/PBMC

15 Una línea celular de mieloma múltiple humano KHM-1B (JCRB) y PBMC humanas (Cellular Technology Limited) fueron cada una ajustadas hasta 5×10^7 células/mL con PBS que contiene 50% Matrigel (Corning Inc.) y se co-injertaron subcutáneamente en una cantidad de 0.1 mL a cada ratón NOD-Scid (hembra, 5 semanas de edad). Después de la inoculación, se agruparon los ratones, y cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 se administró (0.1 mg/kg) dentro de las venas de la cola. La administración se llevó a cabo tres veces cada día a partir de la inoculación día (día 0) al día 2. El eje mayor (mm) y eje menor (mm) del tumor se midieron durante el tiempo a partir de 1 semana después (día 7) usando un calibrador electrónico digital. El volumen tumoral estimado fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

Volumen tumoral estimado (mm^3) = Volumen tumoral promedio estimado de los individuos

Volumen tumoral estimado de cada individuo = Eje mayor $\times$ Eje menor² / 2

25 Se confirmó una eficacia anti-tumoral in cada grupo de administración de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 (FIG. 253).

16)-2 Actividad *in vivo* en el modelo de tumor establecido en ratones reconstituidos con PBMC humanas

30 PBMC humanas se ajustaron hasta 5×10^7 células/mL con PBS y se implantaron en una cantidad de 0.2 mL en la vena de la cola de cada uno de los ratones NOG (hembras, 6 semanas de edad) (día -4). En el día 0, KHM-1B se ajustó hasta 3×10^7 células/mL con PBS que contiene 50% Matrigel y se inoculaban subcutáneamente en una cantidad de 0.1 mL al ratón NOG. Cuando el volumen tumoral estimado del ratón alcanzó aproximadamente 200 mm^3 (día 12), se agruparon los ratones de acuerdo con sus volúmenes del tumor, y cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 se administró (1 mg/kg) dentro de las venas de la cola. La administración se llevó a cabo en los días 12, 15, y 18. El eje mayor (mm) y eje menor (mm) del tumor se midió en el tiempo usando un calibrador electrónico digital. El volumen tumoral estimado se calculó. Los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 mostraron regresión de tumor. Particularmente, se confirmó una eficacia fuerte de regresión de tumor en el grupo de tratamiento con v19125 (FIG. 254).

Ejemplo 17. Preparación de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR

17)-1 Preparación del vector de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR

- 5 17)-1-1 Preparación de los vectores de expresión de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR (C5D-0004, C5D-0005, y C5D-0006)

Entre los vectores de expresión de molécula biespecífica de tipo híbrido (v19125) construidos en el Ejemplo 14)-1-2, pCL_#13561 que codifica el scFv-Fc anti-CD3 humanizado se usó como una plantilla en mutagénesis dirigida al sitio para preparar un vector pC3E-8015 para una forma modificada por CDR que contiene Arg en lugar de Asn53 de la cadena H de CDR2. Similarmente, entre los vectores de expresión de molécula biespecífica de tipo híbrido (v19126), pCL_#13557 que codifica el scFv-Fc anti-CD3 humanizado se usó como una plantilla en mutagénesis dirigida al sitio para preparar un vector pC3E-8017 para una forma modificada por CDR que contiene Arg en lugar de Asn53 de la cadena H de CDR2 y Asn en lugar de la cadena L de Asp52. También, se usó pCL_#13557 como una plantilla en mutagénesis dirigida al sitio para preparar un vector pC3E-8018 para una forma modificada por CDR que contiene Ser en lugar de Asn53 de la cadena H de CDR2 y Asn en lugar de la cadena L de Asp52.

Las secuencias ORF de pC3E-8015, pC3E-8017, y pC3E-8018 se muestran en SEQ ID NO: 224 (FIG. 255), SEQ ID NO: 226 (FIG. 257), y SEQ ID NO: 228 (FIG. 259), respectivamente, del Listado de Secuencias.

- 20 17)-1-2 Preparación de vectores de expresión (C5D-0014, C5D-0015, y C5D-0016) molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR agregada con Lys en el C-terminal

Entre los vectores de expresión (C5D-0004) de molécula biespecífica de tipo híbrido construidos en el Ejemplo 17)-1-1, el pC3E-8015 que codifica el scFv-Fc anti-CD3 humanizado modificado por CDR se usó como una plantilla en mutagénesis dirigida al sitio para preparar un vector pC3E-8025 para una forma modificada en CDR agregada con K que contiene Lys que se inserta a la terminación C de Fc. Similarmente, se usó pC3E-8017 o pC3E-8018 como una plantilla en una mutagénesis dirigida al sitio para preparar los vectores pC3E-8027 y pC3E-8028 para formas modificadas en CDR agregadas con K que contienen Lys insertada in la terminación C de Fc.

Entre los vectores de expresión (v19125 y v19126) de molécula biespecífica de tipo híbrido construidos en el Ejemplo 14)-1-2, pCL_#13555 que codifica el Fab-Fc anti-GPRC5D se usó como una plantilla en mutagénesis dirigida al sitio para preparar un vector pTAA_#2 para una forma agregada con K que contiene Lys insertada en la terminación C de Fc.

Las secuencias ORF de pC3E-8025, pC3E-8027, pC3E-8028, y pTAA_#2 se muestran en SEQ ID NO: 230 (FIG. 261), SEQ ID NO: 232 (FIG. 263), SEQ ID NO: 234 (FIG. 265), y SEQ ID NO: 236 (FIG. 267), respectivamente, del Listado de Secuencias.

17)-2 Producción de molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR

Células CHO-3E7 se subcultivaron y cultivaron de acuerdo con el manual del proveedor (National Research Council Canada, Raymond C. et al., Métodos (2011) 55 (1), 44-51). La solución de las células

CHO-3E7 en la fase de crecimiento logarítmico se diluyó hasta 2×10^6 células/mL con BalanCD Transfectory CHO (Irvine Scientific) que contiene glutamina 4 mM y se usó en la producción de diversos anticuerpos biespecíficos.

Las células ExpiCHO-S se subcultivaron y cultivaron de acuerdo con el manual del proveedor (Thermo Fisher Scientific Inc.). La solución de las células ExpiCHO-S en la fase de crecimiento logarítmico se diluyó hasta 6×10^6 células/mL con medio de expresión ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se usó en la producción de diversos anticuerpos biespecíficos.

17)-2-1 Producción de Anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR (C5D-0004, C5D-0005, y C5D-0006)

Los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 C5D-0004, C5D-0005, y C5D-0006 de tipo híbrido se expresaron por cultivo usando las células ExpiCHO-S como un hospedero. Un método para transfectar las células con los vectores de expresión y condiciones de cultivo se llevaron a cabo todos de acuerdo con el manual anexo al producto (Thermo Fisher Scientific Inc.). El cultivo se efectuó sobre una balanza de 750 mL, y se usaron las condiciones del protocolo de titulación Max descritas en el manual para adición de la alimentación y una temperatura de cultivo. A los 13 días después de iniciar el cultivo, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se filtró a través de un filtro de 0.2 μ m (Sartorius Japan K.K.) para preparar una muestra para evaluación.

Una molécula biespecífica C5D-0004 de tipo híbrido se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8015, pCL_#13555, y pCL_#12123. Una molécula biespecífica de tipo híbrido C5D-0005 se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8017, pCL_#13555, y pCL_#12123. Una molécula biespecífica de tipo híbrido C5D-0006 se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8018, pCL_#13555, y pCL_#12123.

Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0004 obtenidas mediante expresión a partir de los vectores respectivos se muestran en SEQ ID NOs: 225 (FIG. 256), 215 (FIG. 239), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0005 se muestran en SEQ ID NOs: 227 (FIG. 258), 215 (FIG. 239), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0006 se muestran en SEQ ID NOs: 229 (FIG. 260), 215 (FIG. 239), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias.

17)-2-2 Producción de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR agregados con Lys en el C-terminal (C5D-0014, C5D-0015, y C5D-0016)

800 μ g de PEI_{max} (Polysciences) se disolvieron en 3 mL de un medio Opti-Pro SFM (Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar a una solución PEI_{max}. 100 μ g de una mezcla de vectores de pC3E-8025, pTAA_#_#2, y pCL_#_#12123 mezclada a una relación de 1:1:1.5 se agregó a 3 mL de un medio Opti-Pro SFM, y 100 μ g de una mezcla de ADN de pAKT y pGFP mezclada con ADN de esperma de salmón ya fragmentado se agregó a 3 mL de un medio Opti-Pro SFM. La solución PEI_{max}, la mezcla de vectores, y la solución de ADN se combinaron, se agitaron suavemente, se dejaron durante 5 minutos, y luego se agregaron a 200 mL de la solución celular de CHO-3E7. Las células se cultivaron por agitación a 37°C durante 1 día en una incubadora con CO₂ al 5%. Luego, se agregaron a esto 22 mL de suplemento de transfección (Irvine Scientific), 480 μ L de suplemento anti-aglutinante (Thermo Fisher Scientific Inc.), y

500 μ L de ácido valproico (Sigma-Aldrich Corp.). Las células se cultivaron además por agitación a 32°C durante 9 días. A los 10 días después del inicio del cultivo, el sobrenadante de cultivo se recuperó y filtró a través de un filtro de 0.2 μ m (Sartorius Japan K.K.) para preparar una muestra para evaluación.

Una molécula biespecífica de tipo híbrido C5D-0014 se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8025, pTAA_#_#2, y pCL_#_#12123. Una molécula biespecífica de tipo híbrido C5D-0015 se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8027, pTAA_#_#2, y pCL_#_#12123. Una molécula biespecífica de tipo híbrido C5D-0016 se obtuvo a partir de la combinación de pC3E-8028, pTAA_#_#2, y pCL_#_#12123.

Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0014 obtenidas mediante expresión a partir de los vectores respectivos se muestran en SEQ ID NOs: 231 (FIG. 262), 237 (FIG. 268), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0015 se muestran en SEQ ID NOs: 233 (FIG. 264), 237 (FIG. 268), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos que constituyen C5D-0016 se muestran en SEQ ID NOs: 235 (FIG. 266), 237 (FIG. 268), y 217 (FIG. 241) del Listado de Secuencias.

17)-3 Purificación de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR 17)-3-1 Purificación de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR (C5D-0004, C5D-0005, y C5D-0006)

Cada molécula biespecífica se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 17)-2-1 por tres etapas usando cromatografía por afinidad de proteína A, cromatografía de hidroxapatita, y cromatografía de intercambio de cationes. En resumen, el sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS (pH 7.4) para adsorber la molécula biespecífica de interés sobre ella. Los componentes no adsorbidos se retiraron con PBS. Luego, el componente adsorbido se eluyó con una solución amortiguadora de acetato 100 mM (pH 3.5). Las fracciones eluidas se ajustaron inmediatamente hasta un pH neutro con una solución amortiguadora Tris (pH 9.0), luego se dializó contra HEPES 50 mM, fosfato de potasio 10 mM, y una solución de cloruro de sodio 100 mM, y se aplicó a una columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT Tipo-I (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La molécula biespecífica adsorbida de interés se eluyó al cambiar la concentración de cloruro de sodio en el solvente a partir de 0.1 M a 1 M por el gradiente de concentración lineal. Las fracciones pico obtenidas se analizaron por SDS-PAGE para recuperar las fracciones correspondientes a la molécula biespecífica de interés. A continuación, las fracciones recuperadas se reemplazaron en solución amortiguadora con HEPES 50 mM (pH 8.0) y una solución de cloruro de sodio 20 mM y luego se aplicaron a una columna de intercambio de cationes Mono S (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). La molécula biespecífica adsorbida de interés se eluyó al cambiar la concentración de cloruro de sodio en el solvente a partir de 20 mM a 1 M por el gradiente de concentración lineal. Las fracciones pico obtenidas se analizaron por SDS-PAGE para recuperar las fracciones correspondientes a la molécula biespecífica de interés. Las fracciones finales recuperadas se dializaron contra HBSor (histidina 25 mM, sorbitol al 5%, pH 6.0) y se filtraron a través de un filtro para preparar una muestra purificada. La muestra purificada se confirmó definitivamente por espectrometría de masas, SDS-PAGE, y

análisis SEC para ser la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de interés.

17)-3-2 Purificación de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR agregados con Lys en el C-terminal (C5D-0014, C5D-0015, y C5D-0016)

Cada molécula biespecífica se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 17)-2-2 mediante dos etapas usando cromatografía por afinidad de proteína A y cromatografía de hidroxapatita. En resumen, el sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS (pH 7.4) para adsorber la molécula biespecífica de interés sobre ella. Se retiraron los componentes no adsorbidos con PBS. Luego, se eluyó el componente adsorbido con una solución amortiguadora de acetato 100 mM (pH 3.0). Las fracciones eluidas se ajustaron inmediatamente hasta pH neutro con una solución amortiguadora Tris (pH 9.5), luego se dializaron contra HEPES50 mM, fosfato de potasio 10 mM, y una solución de cloruro de sodio 100 mM, y se aplicaron a una columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT Tipo-I (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La molécula biespecífica adsorbida de interés se eluyó al cambiar la concentración de cloruro de sodio en el solvente a partir de 0.1 M a 1 M por el gradiente de concentración lineal. Las fracciones pico obtenidas se analizaron por SDS-PAGE para recuperar fracciones correspondientes a la molécula biespecífica de interés. Las fracciones finales recuperadas se dializaron contra HBsor (histidina 25 mM, sorbitol al 5%, pH 6.0) y se filtraron a través de un filtro para preparar una muestra purificada. La muestra purificada se confirmó definitivamente por espectrometría de masas, SDS-PAGE, y análisis SEC para ser la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de interés.

Ejemplo 18. Evaluación de la actividad *in vitro* de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal

18)-1 Evaluación de la actividad de enlace de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal mediante citometría de flujo

18)-1-1 Enlace de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal a células que expresan GPRC5D humano endógeno (KHM-1B)

La preparación, tinción, y análisis celular se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-1. Como resultado, los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D humano (FIGS. 269A-269C).

18)-1-2-2 Enlace de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal a células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus

La preparación, tinción, y análisis celular se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-2. Como se muestra en las FIGS. 270A-270C, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontró que se enlazaban a células que expresan GPRC5D de mono cynomolgus.

18)-1-3 Enlace de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y

de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal a CD3 humana (PBMC humana)

La preparación, tinción, y análisis celular se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-3. Como resultado, los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontró que se enlazaban a células que expresan CD3 humana (FIGS. 271A-271C).

- 5 18)-1-4 Enlace de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal a CD3 de mono cynomolgus (PBMC de mono cynomolgus)

La preparación, tinción, y análisis celular se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-1-4. Como se muestra en las FIGS. 272A-272C, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 se encontró que se enlazaban a células que expresan CD3 de mono cynomolgus.

18)-2 Evaluación de la actividad citotóxica de anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificados por CDR y de tipo híbrido modificados por CDR agregados por Lys en el C-terminal

El ensayo de actividad citotóxica se llevó a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 15)-2-3 excepto que el tiempo de cultivo fue de 24, 48 o 72 horas. Como se muestra en las FIGS. 273A-273F, estos anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 mostraron actividad citotóxica contra las células KHM-1B.

Ejemplo 19. Evaluación de la Actividad *in vivo* de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 de tipo híbrido modificada por CDR y de tipo híbrido modificada por CDR agregada por Lys en el C-terminal

19)-1 Actividad *in vivo* en modelo de co-injerto de tumor/PBMC

20 KHM-1B y PBMC humana se ajustaron cada una hasta 5×10^7 células/mL con PBS que contiene 50% Matrigel y se cotransplantaron subcutáneamente en cada cantidad de 0.1 mL a cada ratón NOD-Scid (hembra, 5 semanas de edad). Después de la inoculación, se agruparon los ratones, y cada una de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 se administró (1 μ g/kg) dentro de las venas de la cola. La administración se llevó a cabo tres veces cada día a partir del día de la inoculación (día 0) al día 2. El eje mayor (mm) y eje menor (mm) del tumor se midieron durante el tiempo a partir de 1 semana después (día 7) usando un calibrador electrónico digital. El volumen tumoral estimado fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

Volumen tumoral estimado (mm^3) = Volumen tumoral promedio estimado de los individuos

Volumen tumoral estimado de cada individuo = Eje mayor $\times$ Eje menor² / 2

30 La eficacia anti-tumoral se confirmó en cada grupo de administración de la molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 (FIG. 274).

19)-2 Actividad *in vivo* en el modelo de tumor establecido en ratones reconstituidos con PBMC humana

35 PBMC humana fue ajustada hasta 5×10^7 células/mL con PBS e implantada en una cantidad de 0.2 mL dentro de la vena de la cola de cada ratón NOG (hembra, 6 semanas de edad) (día -4). En el día 0, KHM-1B fue ajustado hasta 3×10^7 células/mL con PBS que contiene 50% Matrigel y se inoculó subcutáneamente en una cantidad de 0.1 mL al ratón NOG. Cuando el volumen tumoral estimado del ratón alcanzó aproximadamente 200 mm^3 (día 11), se agruparon los ratones de acuerdo con su volumen de los tumores, y cada molécula biespecífica anti-GPRC5D-anti-CD3 se administró (1 mg/kg) dentro de

las venas de la cola. La administración se llevó a cabo en los días 11, 14, 15, y 17. El eje mayor (mm) y eje menor (mm) del tumor se midieron durante el tiempo usando un calibrador electrónico digital. El volumen tumoral estimado se calculó. Los anticuerpos biespecíficos anti-GPRC5D-anti-CD3 mostraron regresión tumoral (C5D-0004 en la FIG. 275A, C5D-0014 en la FIG. 275B).

5 **Información sobre el Listado de Secuencias**

SEQ ID NO: 1: Secuencia de terminal amino de GPRC5D humano (Figura 2)

SEQ ID NO: 2: Secuencia de terminal amino de GPRC5D humano (Figura 3)

SEQ ID NO: 3: Cebador para la amplificación por PCR del ADNc que codifica la región variable del gen de cadena pesada de 2A4

10 SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2A4 (Figura 8)

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2A4 (Figura 9)

SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 2B1 (Figura 10)

15 SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 2B1 (Figura 11)

SEQ ID NO: 8: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de 7B4 (Figura 12)

SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7B4 (Figura 13)

20 SEQ ID NO: 10: Cebador para la amplificación por PCR del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera gene de 2A4

SEQ ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2A4 (Figura 14)

SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2A4 (Figura 15)

25 SEQ ID NO: 13: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 2B1 (Figura 16)

SEQ ID NO: 14: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 2B1 (Figura 17)

SEQ ID NO: 15: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de 7B4 (Figura 18)

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7B4 (Figura 19)

30 SEQ ID NO: 17: Fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal secretora de cadena κ humana y una región constante de cadena κ humana (Figura 20)

SEQ ID NO: 18: Cebador F para un vector de expresión de cadena ligera (Figura 21)

SEQ ID NO: 19: Cebador R para un vector de expresión de cadena ligera (Figura 22)

35 SEQ ID NO: 20: Fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal humana de cadena pesada y una región constante de IgG1 humana (Figura 23)

SEQ ID NO: 21: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (Figura 24)

- SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (c2A4) (Figura 25)
- SEQ ID NO: 23: Conjunto cebador F para la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (Figura 26)
- SEQ ID NO: 24: Conjunto cebador R para la cadena ligera de 2A4 quimérico humano (Figura 27)
- 5 SEQ ID NO: 25: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (Figura 28)
- SEQ ID NO: 26: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (c2A4) (Figura 29)
- SEQ ID NO: 27: Conjunto cebador F para la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (Figura 30)
- 10 SEQ ID NO: 28: Conjunto cebador R para la cadena pesada de 2A4 quimérico humano (Figura 31)
- SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (Figura 32)
- SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (c2B1) (Figura 33)
- 15 SEQ ID NO: 31: Conjunto cebador F para la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (Figura 34)
- SEQ ID NO: 32: Conjunto cebador R para la cadena ligera de 2B1 quimérico humano (Figura 35)
- SEQ ID NO: 33: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (Figura 36)
- SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (c2B1) (Figura 37)
- 20 SEQ ID NO: 35: Conjunto cebador F para la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (Figura 38)
- SEQ ID NO: 36: Conjunto cebador R para la cadena pesada de 2B1 quimérico humano (Figura 39)
- SEQ ID NO: 37: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (Figura 40)
- 25 SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (c7B4) (Figura 41)
- SEQ ID NO: 39: Conjunto cebador F para la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (Figura 42)
- SEQ ID NO: 40: Conjunto cebador R para la cadena ligera de 7B4 quimérico humano (Figura 43)
- SEQ ID NO: 41: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (Figura 44)
- 30 SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (c7B4) (Figura 45)
- SEQ ID NO: 43: Conjunto cebador F para la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (Figura 46)
- SEQ ID NO: 44: Conjunto cebador R para la cadena pesada de 7B4 quimérico humano (Figura 47)
- 35 SEQ ID NO: 45: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 54)
- SEQ ID NO: 46: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 55)

- SEQ ID NO: 47: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 56)
- SEQ ID NO: 48: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 57)
- 5 SEQ ID NO: 49: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 58)
- SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 59)
- SEQ ID NO: 51: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 60)
- 10 SEQ ID NO: 52: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 61)
- SEQ ID NO: 53: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 62)
- 15 SEQ ID NO: 54: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 63)
- SEQ ID NO: 55: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 64)
- SEQ ID NO: 56: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 2A4 anti-GPRC5D de rata (Figura 65)
- 20 SEQ ID NO: 57: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 66)
- SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 67)
- 25 SEQ ID NO: 59: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 2B1 anti-GPRC5D de rata (Figura 68)
- SEQ ID NO: 60: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 69)
- SEQ ID NO: 61: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 70)
- 30 SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 7B4 anti-GPRC5D de rata (Figura 71)
- SEQ ID NO: 63: Secuencia de nucleótidos de una cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L1) (Figura 72). En esta secuencia, las posiciones de nucleótido 1 a 60 representan una secuencia señal, la cual no está usualmente contenida en las secuencias de nucleótidos de la mayoría de las cadenas ligeras maduras de h2B1.
- 35 SEQ ID NO: 64: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L1) (Figura 73)
- SEQ ID NO: 65: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L2) (Figura 74)

- SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L2) (Figura 75)
- SEQ ID NO: 67: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L3) (Figura 76)
- SEQ ID NO: 68: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L3) (Figura 77)
- SEQ ID NO: 69: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L4) (Figura 78)
- 5 SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L4) (Figura 79)
- SEQ ID NO: 71: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L5) (Figura 80)
- SEQ ID NO: 72: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2B1 humanizada (h2B1_L5) (Figura 81)
- SEQ ID NO: 73: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H1) (Figura 82)
- SEQ ID NO: 74: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H1) (Figura 83)
- 10 SEQ ID NO: 75: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H2) (Figura 84)
- SEQ ID NO: 76: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H2) (Figura 85)
- SEQ ID NO: 77: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H3) (Figura 86)
- SEQ ID NO: 78: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H3) (Figura 87)
- SEQ ID NO: 79: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H4) (Figura 88)
- 15 SEQ ID NO: 80: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 2B1 (h2B1_H4) (Figura 89)
- SEQ ID NO: 81: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L1) (Figura 90)
- SEQ ID NO: 82: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L1) (Figura 91)
- SEQ ID NO: 83: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L2) (Figura 92)
- SEQ ID NO: 84: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada 7B4 (h7B4_L2) (Figura 93)
- 20 SEQ ID NO: 85: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H1) (Figura 94)
- SEQ ID NO: 86: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H1) (Figura 95)
- SEQ ID NO: 87: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H2) (Figura 96)
- SEQ ID NO: 88: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H2) (Figura 97)
- SEQ ID NO: 89: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H3) (Figura 98)
- 25 SEQ ID NO: 90: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H3) (Figura 99)
- SEQ ID NO: 91: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H5) (Figura 100)
- SEQ ID NO: 92: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada 7B4 (h7B4_H5) (Figura 101)
- SEQ ID NO: 93: Secuencia de aminoácidos del péptido terminal amino de GPRC5D de mono cynomolgus
- 30 (Figura 105)
- SEQ ID NO: 94: Secuencia de nucleótidos de cebador A usado en el análisis de secuencia de scFv (Figura 106)
- SEQ ID NO: 95: Secuencia de nucleótidos de cebador B usado en el análisis de secuencia de scFv (Figura 107)
- 35 SEQ ID NO: 96: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2037 (Figura 108)
- SEQ ID NO: 97: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2037 (Figura 109)
- SEQ ID NO: 98: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C2037 (Figura 110)

- SEQ ID NO: 99: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C2037 (Figura 111)
- SEQ ID NO: 100: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C3048 (Figura 112)
- 5 SEQ ID NO: 101: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3048 (Figura 113)
- SEQ ID NO: 102: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C3048 (Figura 114)
- SEQ ID NO: 103: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3048 (Figura 115)
- 10 SEQ ID NO: 104: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C3015 (Figura 116)
- SEQ ID NO: 105: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3015 (Figura 117)
- SEQ ID NO: 106: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C3015 (Figura 118)
- 15 SEQ ID NO: 107: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3015 (Figura 119)
- SEQ ID NO: 108: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C3022 (Figura 120)
- SEQ ID NO: 109: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3022 (Figura 121)
- 20 SEQ ID NO: 110: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de C3022 (Figura 122)
- SEQ ID NO: 111: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C2037 (Figura 124)
- SEQ ID NO: 112: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C2037 (Figura 125)
- SEQ ID NO: 113: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C2037 (Figura 126)
- SEQ ID NO: 114: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C2037 (Figura 127)
- 25 SEQ ID NO: 115: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C2037 (Figura 128)
- SEQ ID NO: 116: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C2037 (Figura 129)
- SEQ ID NO: 117: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C3048 (Figura 130)
- SEQ ID NO: 118: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C3048 (Figura 131)
- SEQ ID NO: 119: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C3048 (Figura 132)
- 30 SEQ ID NO: 120: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C3048 (Figura 133)
- SEQ ID NO: 121: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C3048 (Figura 134)
- SEQ ID NO: 122: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C3048 (Figura 135)
- SEQ ID NO: 123: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C3015 (Figura 136)
- SEQ ID NO: 124: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C3015 (Figura 137)
- 35 SEQ ID NO: 125: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C3015 (Figura 138)
- SEQ ID NO: 126: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C3015 (Figura 139)
- SEQ ID NO: 127: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C3015 (Figura 140)
- SEQ ID NO: 128: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C3015 (Figura 141)

- SEQ ID NO: 129: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C3022 (Figura 142)
- SEQ ID NO: 130: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C3022 (Figura 143)
- SEQ ID NO: 131: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C3022 (Figura 144)
- SEQ ID NO: 132: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C3022 (Figura 145)
- 5 SEQ ID NO: 133: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C3022 (Figura 146)
- SEQ ID NO: 134: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C3022 (Figura 147)
- SEQ ID NO: 135: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3022 (Figura 123)
- SEQ ID NO: 136: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C2037 (Figura 10 148)
- SEQ ID NO: 137: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C2037 (Figura 149)
- SEQ ID NO: 138: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3048 (Figura 150)
- 15 SEQ ID NO: 139: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C3048 (Figura 151)
- SEQ ID NO: 140: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3015 (Figura 152)
- SEQ ID NO: 141: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C3015 (Figura 20 153)
- SEQ ID NO: 142: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3022 (Figura 154)
- SEQ ID NO: 143: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C3022 (Figura 155)
- 25 SEQ ID NO: 144: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C2037 (Figura 156)
- SEQ ID NO: 145: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C2037 (Figura 157)
- SEQ ID NO: 146: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3048 (Figura 30 158)
- SEQ ID NO: 147: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C3048 (Figura 159)
- SEQ ID NO: 148: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3015 (Figura 160)
- 35 SEQ ID NO: 149: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de una forma de IgG de C3015 (Figura 161)
- SEQ ID NO: 150: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de una forma de IgG de C3022 (Figura 162)

- SEQ ID NO: 151: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de the IgG form de C3022 (Figura 163)
- SEQ ID NO: 152: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 de rata (Figura 168)
- 5 SEQ ID NO: 153: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de el anticuerpo anti-CD3 de rata (Figura 169)
- SEQ ID NO: 154: Secuencia de nucleótidos de C3E7000 (Figura 170)
- SEQ ID NO: 155: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3E7034 (Figura 171)
- 10 SEQ ID NO: 156: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E7034 (Figura 172)
- SEQ ID NO: 157: Secuencia de nucleótidos de C3E7034 (Figura 173)
- SEQ ID NO: 158: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E7035 (Figura 174)
- SEQ ID NO: 159: Secuencia de nucleótidos de C3E7035 (Figura 175)
- 15 SEQ ID NO: 160: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E7036 (Figura 176)
- SEQ ID NO: 161: Secuencia de nucleótidos de C3E7036 (Figura 177)
- SEQ ID NO: 162: Secuencia de nucleótidos de C2037-C3E7034 (Figura 178)
- SEQ ID NO: 163: Secuencia de nucleótidos de C3048-C3E7034 (Figura 179)
- 20 SEQ ID NO: 164: Secuencia de nucleótidos de C3022-C3E7034 (Figura 180)
- SEQ ID NO: 165: Secuencia de nucleótidos de C2037-C3E7035 (Figura 181)
- SEQ ID NO: 166: Secuencia de nucleótidos de C3048-C3E7035 (Figura 182)
- SEQ ID NO: 167: Secuencia de nucleótidos de C3022-C3E7035 (Figura 183)
- SEQ ID NO: 168: Secuencia de nucleótidos de C2037-C3E7036 (Figura 184)
- 25 SEQ ID NO: 169: Secuencia de nucleótidos de C3048-C3E7036 (Figura 185)
- SEQ ID NO: 170: Secuencia de nucleótidos de C3022-C3E7036 (Figura 186)
- SEQ ID NO: 171: Secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7034 (Figura 187)
- SEQ ID NO: 172: Secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7034 (Figura 188)
- SEQ ID NO: 173: Secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7034 (Figura 189)
- 30 SEQ ID NO: 174: Secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7035 (Figura 190)
- SEQ ID NO: 175: Secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7035 (Figura 191)
- SEQ ID NO: 176: Secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7035 (Figura 192)
- SEQ ID NO: 177: Secuencia de aminoácidos de C2037-C3E7036 (Figura 193)
- SEQ ID NO: 178: Secuencia de aminoácidos de C3048-C3E7036 (Figura 194)
- 35 SEQ ID NO: 179: Secuencia de aminoácidos de C3022-C3E7036 (Figura 195)
- SEQ ID NO: 180: Secuencia de aminoácidos de C3E7034 (Figura 203)
- SEQ ID NO: 181: Secuencia de aminoácidos de C3E7035 (Figura 204)
- SEQ ID NO: 182: Secuencia de aminoácidos de C3E7036 (Figura 205)

- SEQ ID NO: 183: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada de C3E7000 (Figura 206)
- SEQ ID NO: 184: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de C3E7000 (Figura 207)
- SEQ ID NO: 185: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada de C3E7000 (Figura 208)
- SEQ ID NO: 186: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera de C3E7000 (Figura 209)
- 5 SEQ ID NO: 187: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de C3E7000 (Figura 210)
- SEQ ID NO: 188: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de C3E7000 (Figura 211)
- SEQ ID NO: 189: Secuencia de aminoácidos de CD3 humana ϵ (Figura 212)
- SEQ ID NO: 190: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de E1018 (Figura 213)
- 10 SEQ ID NO: 191: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de E1018 (Figura 214)
- SEQ ID NO: 192: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de E1018 (Figura 215)
- SEQ ID NO: 193: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de E1018 (Figura 216)
- 15 SEQ ID NO: 194: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de D1012 (Figura 217)
- SEQ ID NO: 195: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de D1012 (Figura 218)
- SEQ ID NO: 196: Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera de D1012 (Figura 219)
- 20 SEQ ID NO: 197: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de D1012 (Figura 220)
- SEQ ID NO: 198: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 HC_1 (Figura 222)
- SEQ ID NO: 199: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 HC_1 (Figura 223)
- SEQ ID NO: 200: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 HC_2 (Figura 224)
- 25 SEQ ID NO: 201: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 HC_2 (Figura 225)
- SEQ ID NO: 202: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 LC_1 (Figura 226)
- SEQ ID NO: 203: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 LC_1 (Figura 227)
- SEQ ID NO: 204: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 LC_2 (Figura 228)
- SEQ ID NO: 205: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 LC_2 (Figura 229)
- 30 SEQ ID NO: 206: Secuencia de nucleótidos del Fab de C3E-7034 HC (Figura 230)
- SEQ ID NO: 207: Secuencia de aminoácidos del Fab de C3E-7034 HC (Figura 231)
- SEQ ID NO: 208: Secuencia de nucleótidos del Fab de C3E-7034 LC (Figura 232)
- SEQ ID NO: 209: Secuencia de aminoácidos del Fab de C3E-7034 LC (Figura 233)
- SEQ ID NO: 210: Secuencia de nucleótidos del Fab de C3E-7036 HC (Figura 234)
- 35 SEQ ID NO: 211: Secuencia de aminoácidos del Fab de C3E-7036 HC (Figura 235)
- SEQ ID NO: 212: Secuencia de nucleótidos del Fab de C3E-7036 LC (Figura 236)
- SEQ ID NO: 213: Secuencia de aminoácidos del Fab de C3E-7036 LC (Figura 237)
- SEQ ID NO: 214: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 HC_3 (Figura 238)

- SEQ ID NO: 215: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 HC_3 (Figura 239)
- SEQ ID NO: 216: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 LC_3 (Figura 240)
- SEQ ID NO: 217: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 LC_3 (Figura 241)
- SEQ ID NO: 218: Secuencia de nucleótidos del scFv Fc de C3E-7034 (Figura 242)
- 5 SEQ ID NO: 219: Secuencia de aminoácidos del scFv Fc de C3E-7034 (Figura 243)
- SEQ ID NO: 220: Secuencia de nucleótidos del scFv Fc de C3E-7036 (Figura 244)
- SEQ ID NO: 221: Secuencia de aminoácidos del scFv Fc de C3E-7036 (Figura 245)
- SEQ ID NO: 222: Secuencia de nucleótidos del scFv Fc de h2B1 (Figura 246)
- SEQ ID NO: 223: Secuencia de aminoácidos del scFv Fc de h2B1 (Figura 247)
- 10 SEQ ID NO: 224: Secuencia de nucleótidos de C3E-8015 (Figura 255)
- SEQ ID NO: 225: Secuencia de aminoácidos de C3E-8015 (Figura 256)
- SEQ ID NO: 226: Secuencia de nucleótidos de C3E-8017 (Figura 257)
- SEQ ID NO: 227: Secuencia de aminoácidos de C3E-8017 (Figura 258)
- SEQ ID NO: 228: Secuencia de nucleótidos de C3E-8018 (Figura 259)
- 15 SEQ ID NO: 229: Secuencia de aminoácidos de C3E-8018 (Figura 260)
- SEQ ID NO: 230: Secuencia de nucleótidos de C3E-8025 (Figura 261)
- SEQ ID NO: 231: Secuencia de aminoácidos de C3E-8025 (Figura 262)
- SEQ ID NO: 232: Secuencia de nucleótidos de C3E-8027 (Figura 263)
- SEQ ID NO: 233: Secuencia de aminoácidos de C3E-8027 (Figura 264)
- 20 SEQ ID NO: 234: Secuencia de nucleótidos de C3E-8028 (Figura 265)
- SEQ ID NO: 235: Secuencia de aminoácidos de C3E-8028 (Figura 266)
- SEQ ID NO: 236: Secuencia de nucleótidos del Fab de h2B1 HC_4 (Figura 267)
- SEQ ID NO: 237: Secuencia de aminoácidos del Fab de h2B1 HC_4 (Figura 268)
- SEQ ID NO: 238: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada de una forma modificada por
- 25 CDR (Figura 276) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- SEQ ID NO: 239: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera de la forma modificada por CDR (Figura 277) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- SEQ ID NO: 240: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de una forma modificada por CDR de C3E-7034 (Figura 278) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- 30 SEQ ID NO: 241: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de la forma modificada por CDR de C3E-7034 (Figura 279) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- SEQ ID NO: 242: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de una forma modificada por CDR de C3E-7035 (Figura 280) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- SEQ ID NO: 243: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de una forma
- 35 modificada por CDR de C3E-7036 (Figura 281) en donde X es un aminoácido natural arbitrario.
- SEQ ID NO: 244: Secuencia de aminoácidos de C3E-7078 (Figura 282)
- SEQ ID NO: 245: Secuencia de aminoácidos de C3E-7085 (Figura 283)
- SEQ ID NO: 246: Secuencia de aminoácidos de C3E-7086 (Figura 284)

SEQ ID NO: 247: Secuencia de aminoácidos de C3E-7087 (Figura 285)

SEQ ID NO: 248: Secuencia de aminoácidos de C3E-7088 (Figura 286)

SEQ ID NO: 249: Secuencia de aminoácidos de C3E-7089 (Figura 287)

5 SEQ ID NO: 250: Secuencia de aminoácidos de C3E-7090 (Figura 288)

SEQ ID NO: 251: Secuencia de aminoácidos de C3E-7091 (Figura 289)

SEQ ID NO: 252: Secuencia de aminoácidos de C3E-7092 (Figura 290)

SEQ ID NO: 253: Secuencia de aminoácidos de C3E-7093 (Figura 291)

SEQ ID NO: 254: Secuencia de aminoácidos de C3E-7094 (Figura 292)

10 SEQ ID NO: 255: Secuencia de aminoácidos de C3E-7095 (Figura 293)

15

20

25

30

35