

ANTICUERPOS QUE SE FIJAN A GPRC5D

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a anticuerpos que se fijan a GPRC5D, que incluyen moléculas de fijación al antígeno biespecíficas, por ejemplo, para activar linfocitos T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican tales anticuerpos, y vectores y células huésped que comprenden tales polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir los anticuerpos y a métodos para usarlos en el tratamiento de una enfermedad.

ANTECEDENTES

El mieloma múltiple (MM), que afecta a ~75.000 pacientes nuevos cada año en la UE y EE. UU., es una de las neoplasias hematológicas más comunes, que representa una importante necesidad médica no satisfecha. El mieloma múltiple se caracteriza por células plasmáticas terminalmente diferenciadas que segregan inmunoglobulinas monoclonales no funcionales. En el corto plazo, los fármacos inmunomoduladores tales como lenalidomida y pomalidomida, e inhibidores de proteasoma tales como carfilzomib o bortezomib, podrán seguir siendo el pilar del tratamiento de 1.^a línea para el mieloma múltiple (Moreau, P. y S.V. Rajkumar, multiple myeloma-translation of trial results into reality. Lancet, 2016. 388(10040): páginas 111-3). Sin embargo, estos fármacos no se dirigen específicamente a las células tumorales enfermas, por ejemplo, células plasmáticas (PC) enfermas. Se han hecho esfuerzos para disminuir de manera selectiva las células plasmáticas en mieloma múltiple. La falta de proteínas superficiales que marcan específicamente células plasmáticas ha obstaculizado el desarrollo de anticuerpos o tratamientos celulares contra el mieloma múltiple. Hasta ahora, solo hay unos pocos compuestos biológicos exitosos, que incluyen daratumumab (anti-CD38) y elotuzumab (anti-CD319), con la advertencia de que las células plasmáticas no expresan de manera única estas dos moléculas. Por lo tanto, se identificaron novedosas dianas para células plasmáticas en mieloma múltiple mediante secuenciación de ARN, tal como el miembro D del grupo 5 de la clase C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D), que es expresado diferencialmente por células plasmáticas en mieloma múltiple en comparación con células plasmáticas de donantes sanos. Se ha informado que GPRC5D se asocia con la prognosis y carga tumoral en pacientes con mieloma múltiple (Atamaniuk, J., et al., Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. Eur J

Clin Invest, 2012. 42(9): páginas 953-60; y Cohen, Y., et al., GPRC5D is a promising marker for monitoring the tumour load and to target multiple myeloma cells. Hematology, 2013. 18(6): páginas 348-51).

GPRC5D es un receptor huérfano sin ligando conocido y se desconoce ampliamente en los hombres en general y en el cáncer específicamente. El gen codificante GPRC5D, que se mapea en el cromosoma 12p13.3, contiene tres exones y abarca alrededor de 9,6 kb (Brauner-Osborne, H., et al., Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. Biochim Biophys Acta, 2001. 1518(3): páginas 237-48). El primer exón grande codifica el dominio siete-transmembrana. Se ha demostrado que GPRC5D está implicado en la formación de queratina en folículos pilosos en animales (Gao, Y., et al., Comparative Transcriptome Analysis of Fetal Skin Reveals Key Genes Related to Hair Follicle Morphogenesis in Cashmere Goats. PLoS One, 2016. 11(3): página e0151118; y Inoue, S., T. Nambu, y T. Shimomura, The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. J Invest Dermatol, 2004. 122(3): páginas 565-73).

WO 2018/017786 A2 divulga anticuerpos o fragmentos de fijación al antígeno específicos de GPRC5D.

Dado que no todos los tratamientos de referencia son capaces de curar a pacientes con mieloma múltiple, existe una clara necesidad de desarrollar nuevos tratamientos potentes y específicos. Uno de estos enfoques incluye anticuerpos que se fijan a GPRC5D, en particular anticuerpos biespecíficos que se fijan a GPRC5D en células dianas y un antígeno de linfocito T de activación, tal como CD3 en linfocitos T. Tras la fijación simultánea de tal anticuerpo a ambas de sus dianas, se formará una sinapsis de linfocitos T, lo que llevará a la activación del linfocito T (citotóxico) y la posterior lisis de la célula diana.

La presente invención proporciona anticuerpos novedosos, que incluyen anticuerpos biespecíficos que se fijan específicamente a GPRC5D humano. Particularmente, los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T de acuerdo con la invención que se dirigen a GPRC5D tienen la potencia para tratar el mieloma múltiple.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Los presentes inventores han desarrollado moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que se fijan a GPRC5D y un antígeno de linfocito T de activación, que incorpora el

anticuerpo contra GPRC5D novedoso.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; (ii) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; (iii) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; (iv) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; o (v) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno comprende (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende

una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 29, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 30 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 31, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 32, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 33 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 34; (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; o (ii) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 106, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 107 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 108, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 109, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 110 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 111.

En otra forma de realización, (i) la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 13, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o (ii) la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 15, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o (iii) la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 48, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o (iv) en donde la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 49, y en donde la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de

aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; o (v) la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 57, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; o (vi) la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 58, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En otra forma de realización, la VH de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos (i) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; (ii) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; o (iii) que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113.

En una forma de realización, la primera y/o la segunda porción de fijación al antígeno son una molécula Fab. Esto significa que la primera porción de fijación al antígeno puede ser una molécula Fab, o la segunda porción de fijación al antígeno puede ser una molécula Fab, o la primera porción de fijación al antígeno y la segunda porción de fijación al antígeno pueden ser moléculas Fab. En otra forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab, en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1, particularmente los dominios variables VL y VH, de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí. En otra forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab, en donde,

en el dominio constante, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otra forma de realización, la primera y la segunda porción de fijación al antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente a través de un ligador peptídico. En otra forma de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno son una molécula Fab y en donde (i) la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno, o (ii) la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno. En otra forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende una tercera porción de fijación al antígeno. En otra forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno. En otra forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. En otra forma de realización, cada una de la primera, la segunda y, cuando está presente, la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab; y en donde (i) la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno y la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera subunidad del dominio Fc, o (ii) la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera subunidad del dominio Fc; y en donde la tercera porción de fijación al antígeno, cuando está presente, se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la segunda subunidad del dominio Fc. En otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG. En otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. Aun en otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En otra forma de realización, un residuo de aminoácido en el dominio CH3 de la primera

subunidad del dominio Fc se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, lo que genera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo de aminoácido en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, lo que genera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la cual es posicionable la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad. En otra forma de realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la fijación a un receptor Fc y/o la función efectora.

En otro aspecto, la invención proporciona uno o más polinucleótidos aislados que codifican la molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente. En un aspecto adicional, la invención proporciona uno o más vectores, particularmente vectores de expresión, que comprenden los polinucleótidos como se describen en la presente. En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende los polinucleótidos o los vectores como se describen en la presente.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una molécula de fijación al antígeno biespecífica que se fija a GPRC5D, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped como se describe en la presente en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de fijación al antígeno biespecífica y b) opcionalmente recuperar la molécula de fijación al antígeno biespecífica.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que se fija a GPRC5D, producida mediante el método de acuerdo con la reivindicación 21.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica como se divulga en la presente o una composición farmacéutica como se divulga en la presente para su uso como un medicamento.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica como se divulga en la presente o una composición farmacéutica como se

divulga en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica o composición farmacéutica como se divulga en la presente, en donde la enfermedad es cáncer o una enfermedad autoinmunitaria.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica o composición farmacéutica como se divulga en la presente, en donde la enfermedad es mieloma múltiple.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una molécula de fijación al antígeno biespecífica como se divulga en la presente en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad, particularmente cáncer, más particularmente mieloma múltiple, en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Alternativamente, la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, tal como lupus eritematoso sistémico y/o artritis reumatoide. En cualquiera de las formas de realización anteriores, el individuo es preferentemente un mamífero, particularmente un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-Z. Configuraciones de ejemplo de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención. (Figura 1A, Figura 2D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (Figura 1B, Figura 1E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con orden alternativo de los componentes Fab y Crossfab ("invertidos"). (Figura 1C, Figura 1F) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab". (Figura 1G, Figura 1K) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab" con orden alternativo de los componentes Fab y Crossfab ("invertidos"). (Figura 1H, Figura 1L) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab". (Figura 1I, Figura 1M) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab. (Figura 1J, Figura 1N) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab y orden alternativo de los componentes Fab y Crossfab ("invertidos"). (Figura 1O, Figura 1S) Ilustración de la molécula "Fab-Crossfab". (Figura 1P, Figura 1T) Ilustración de la molécula "Crossfab-Fab". (Figura 1Q, Figura 1U) Ilustración de la molécula "(Fab)₂-Crossfab". (Figura 1R, Figura 1V) Ilustración de la molécula "Crossfab-(Fab)₂". (Figura

1W, Figura 1Y) Ilustración de la molécula "Fab-(Crossfab)₂". (Figura 1X, Figura 1Z) Ilustración de la molécula "(Crossfab)₂-Fab". Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas opcionalmente introducidos en los dominios CH1 y CL. Las moléculas Crossfab se representan como que comprenden un intercambio de las regiones VH y VL, pero, en formas de realización en donde no se introduce ninguna modificación de carga en los dominios CH1 y CL, pueden comprender alternativamente un intercambio de los dominios CH1 y CL.

Figura 2. Análisis de la expresión génica de dianas tumorales en células plasmáticas y linfocitos B mediante ARNseq.

Figura 3. Configuraciones de ejemplo de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas 5E11 de la invención. Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas opcionalmente introducidos en los dominios CH1 y CL.

Figuras 4A-C. Análisis de fijación de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas 5F11-TCB (Figura 4A) y 5E11-TCB (Figura 4B) y anticuerpo de control ET150-5-TCB (Figura 4C) a las líneas celulares de mieloma múltiple que expresan GPRC5D AMO-1, L636, NCI-H929, RPMI-8226, OPM-2 y células de control WSU-DLCL2.

Figuras 5A-E. Análisis de la citotoxicidad de linfocitos T mediada por GPRC5D-TCB en las líneas celulares de mieloma múltiple AMO-1 (Figura 5A), NCI-H929 (Figura 5B), RPMI-8226 (Figura 5C) y L363 (Figura 5D). La línea celular de control es WSU-DLCL2 (Figura 5E). Moléculas evaluadas: 5E11-TCB, 5F11-TCB. Moléculas de control: DP47-TCB (no dirigida) y ET150-5-TCB.

Figura 6. Análisis de acoplamiento de linfocitos T activado por GPRC5D-TCB con las líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929 y la línea celular de control negativo WSU-DLCL2 que regula de manera ascendente CD25 y CD69.

Figuras 7A-J. Activación de linfocitos T, según se determina mediante la regulación ascendente de CD25 en linfocitos T CD8+, tras la incubación de linfocitos T con concentraciones crecientes de GPRC5D-TCB o DP47-TCB de control negativo en presencia de AMO-1 (Figura 7A), NCI-H929 (Figura 7B), RPMI-8226 (Figura 7C), L363 (Figura 7D) y WSU-DLCL2 (Figura 7E); y según se determina mediante la regulación ascendente de CD69 en linfocitos T CD8+ tras la incubación de linfocitos T con

concentraciones crecientes de GPRC5D-TCBs o DP47-TCB de control negativo en presencia de AMO-1 (Figura 7F), NCI-H929 (Figura 7G), RPMI-8226 (Figura 7H), L363 (Figura 7I) y WSU-DLCL2 (Figura 7J).

Figuras 8A-B. Visualización de la ubicación e internalización del anticuerpo mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 8A) y análisis de las intensidades de señal de membrana en comparación con citoplasma (Figura 8B).

Figura 9. Se evaluó mediante ELISA la fijación de los diferentes anticuerpos anti-GPRC5D a GPRC5D humano, murino y de Macaca fascicularis, mediante el uso de clones de CHO transfectados de manera estable que expresaban GPRC5D humano (clon 12) o GPRC5D de Macaca fascicularis (clon 13), GPRC5D murino (clon 4) o GPRC5A humano (clon 30).

Figuras 10A-G. Lisis mediada por linfocitos T de diversas líneas celulares de mieloma múltiple (MM) inducidas por moléculas biespecíficas de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D o BCMA durante 20 horas de coincubación (E:T = 10:1, linfocitos T Pan humanos). Se representan duplicados con SD.

Figuras 11A-F. Activación de linfocitos T inducida por diferentes moléculas biespecíficas de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D o BCMA (5E11-TCB en la Figura 11A; 5F11-TCB en la Figura 11B; 10B10-TCB en la Figura 11C; BCMA-TCB en la Figura 11D; B72-TCB en la Figura 11E; DP47-TCB en la Figura 11F) durante ~20 horas de coincubación de linfocitos T Pan humanos alógenos y células de la médula ósea no procesadas de donantes sanos (E:T = 10:1, linfocitos T Pan humanos). Se representan diagramas de puntos de FACS de un donante representativo, que muestra la regulación ascendente del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD4 (fila superior) o CD8 (fila inferior) como un porcentaje de linfocitos positivos entre todos los linfocitos T CD4 y CD8 respectivos.

Figuras 12A-B. Activación de linfocitos T inducida por diferentes moléculas biespecíficas de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D o BCMA durante ~20 horas de coincubación de linfocitos T Pan humanos alógenos y células de la médula ósea no procesadas de donantes sanos (E:T = 10:1, linfocitos T Pan humanos). Se representa un resumen de los cuatro donantes evaluados, que muestra la regulación ascendente del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD8 a la dosis fija seleccionada de 50 nM del TCB (Figura 12A) o 5 nM (Figura 12B).

Figuras 13A-D. Eficacia *in vivo* inducida por diferentes moléculas biespecíficas de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D (5F11-TCB en la Figura 13A; BCMA-TCB en la Figura 13B; B72-TCB en la Figura 13C; vehículo en la Figura 13D), como se representa mediante una cinética de crecimiento tumoral con el tiempo en un modelo de ratones NSG humanizados, injertados con células tumorales NCI-H929. Se representan gráficos de araña, en donde cada línea se refiere a un único ratón.

Figuras 14A-D. Eficacia *in vivo* inducida por diferentes moléculas biespecíficas de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D (5F11-TCB en la Figura 14A; 5E11-TCB en la Figura 14B; B72-TCB en la Figura 14C; vehículo en la Figura 14D), como se representa mediante una cinética de crecimiento tumoral con el tiempo en un modelo de ratones NSG humanizados, injertados con células tumorales OPM-2. Se representan gráficos de araña, en donde cada línea se refiere a un único ratón.

Figuras 15A-B. Activación de PGLALA-CAR-J después de aproximadamente 16 horas de incubación, según se determina mediante luminiscencia. Lo último se induce tras la fijación simultánea de las IgG de GPRC5D (5F11-IgG en la Figura 15A; 5E11-IgG en la Figura 15B) a la línea celular de mieloma múltiple que expresa GPRC5D L-363 y del dominio Fc modificado por PGLALA a células indicadoras Jurkat-NFAT, que se diseñaron por ingeniería genética para expresar un TCR dirigido contra la mutación de PGLALA en la parte Fc de estas moléculas de IgG. Se representan duplicados con SD.

Figuras 16A-D. Fijación de las moléculas de TCB humanizadas en comparación con TCB parentales a GPRC5D humano en células NCI-H929 (Figuras 16A y 16B) y CD3 humano en células Jurkat (Figura 16C y 16D) expresados en células.

Figuras 17A-G. Ensayo de activación de Jurkat-NFAT en presencia de diferentes moléculas de TCB biespecíficas GPRC5DxCD3 (Figura 17A – G) en comparación con TCB de control no dirigido, según se indica.

Figuras 18A-D. Ensayo de lisis de células tumorales en comparación con moléculas GPRC5D-TCB como se presentan en la presente y moléculas que se sabe en la técnica que se dirigen a GPRC5D o BCMA en comparación con una molécula de TCB de referencia no dirigida.

Figura 19. Activación de linfocitos T autólogos tras la incubación de una muestra de MM primario con diferentes moléculas biespecíficas que se acoplan a CD3. Se compararon GPRC5D-TCB como se presentan en la presente con moléculas que se sabe

en la técnica que se dirigen a GPRC5D o BCMA en comparación con una molécula de TCB de referencia no dirigida.

Figuras 20 A-D. Disminución de linfocitos B tras la incubación de PBMC de donantes sanos con diferentes moléculas biespecíficas que se acoplan a CD3. Se compararon GPRC5D-TCB como se presentan en la presente con moléculas que se sabe en la técnica que se dirigen a GPRC5D o BCMA en comparación con una molécula de TCB de referencia no dirigida. Se usaron anticuerpos a concentraciones de 50 nM (Figura 20A), 5 nM (Figura 20B), 0,5 nM (Figura 20C) y 0,05 nM (Figura 20D).

Figuras 21A-B. Activación de linfocitos T tras la incubación de muestras de médula ósea de donantes sanos con diferentes moléculas biespecíficas que se acoplan a CD3. Se compararon GPRC5D-TCB como se presentan en la presente con moléculas conocidas en la técnica. La activación se determinó mediante la detección del porcentaje de linfocitos T CD69⁺CD8⁺ (Figura 21A) y linfocitos T CD69⁺CD4⁺ (Figura 21B) que se usaron entre todos los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ respectivos.

Figuras 22 A-B. Lecturas de liberación de citocinas de sangre entera humana de donantes sanos (TNFa) en la Figura 22A; lecturas de IL6 en la Figura 22B). Se compararon GPRC5D-TCB como se describen en la presente y moléculas de referencia positivas (Gazyva, Lemtrada) y negativas (Erbix).

Figuras 23 A-G. Eficacia *in vivo* de diferentes moléculas biespecíficas GPRC5DxCD3 de TCB en NCI-H929 (ratones hNSG), que incluye el volumen tumoral promedio por grupo de tratamiento durante el transcurso del tratamiento (Figura 23A), el volumen tumoral en el día 37 (Figura 23B) y el crecimiento tumoral de las moléculas, en donde cada línea representa un único ratón (vehículo: Figura 23C; 6623: Figura 23D; 6624: Figura 23E, 6625: Figura 23F, 6626: Figura 23G).

Figura 24. SDPK *in vivo* en ratones hFcRn Tg y KO y datos de depuración de las moléculas de TCB indicadas.

Figuras 25 A-I. Ejemplos representativos del análisis de fijación de la molécula de fijación al antígeno biespecífica 5E11(6625)-TCB a las líneas celulares de mieloma múltiple que expresan GPRC5D humano OPM-2 (Figura 25A, Figura 25D, Figura 25G), NCI-H929 (Figura 25B, Figura 25E, Figura 25H) y RPMI-8226 (Figura 25C, Figura 25F, Figura 25I). La cantidad de sitios de fijación del anticuerpo (ABS) contra GPRC5D por línea celular se proporcionan entre paréntesis y se determinaron previamente mediante

QSC (Quantum Simply Cellular, BangsLabs). Se representan los valores de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) relativa a partir de triplicados con SD. Se calcularon valores de EC50 de fijación mediante GraphPadPrism y se resumen en la Tabla 14.2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

En la presente se usan términos como generalmente se usan en la técnica, a menos que se definan de otro modo a continuación.

Como se usa en la presente, la expresión "molécula de fijación al antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se fija específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de fijación al antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de estas.

El término "biespecífica" significa que la molécula de fijación al antígeno es capaz de fijarse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Por lo general, una molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende dos sitios de fijación al antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica es capaz de fijarse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

Como se usa en la presente, el término "valente" denota la presencia de una cantidad especificada de sitios de fijación al antígeno en una molécula de fijación al antígeno. Como tal, la expresión "fijación monovalente a un antígeno" denota la presencia de un (y no más de un) sitio de fijación al antígeno específico para el antígeno en la molécula de fijación al antígeno.

Un "sitio de fijación al antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos de aminoácidos, de una molécula de fijación al antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de fijación al antígeno de un anticuerpo comprende residuos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa tiene por lo general dos sitios de fijación al antígeno; una molécula Fab tiene por lo general un único sitio de fijación al antígeno.

Como se usa en la presente, la expresión "porción de fijación al antígeno" se refiere a una molécula de polipéptido que se fija específicamente a un determinante antigénico. En

una forma de realización, una porción de fijación al antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unida (por ejemplo, una segunda porción de fijación al antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que porta el determinante antigénico. En otra forma de realización una porción de fijación al antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo receptor de linfocitos T. Las porciones de fijación al antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de estos como se definen adicionalmente en la presente. Las porciones de fijación al antígeno particulares incluyen un dominio de fijación al antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una región variable de la cadena liviana del anticuerpo. En ciertas formas de realización, las porciones de fijación al antígeno pueden comprender regiones constantes del anticuerpo como se definen adicionalmente en la presente y se conocen en la técnica. Las regiones constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la cadena liviana útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

Como se usa en la presente, la expresión "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, una porción contigua de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula de polipéptido a la que se fija una porción de fijación al antígeno, lo que forma un complejo porción de fijación al antígeno-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo, y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas a las que se hace referencia como antígenos en la presente (por ejemplo GPRC5D, CD3) pueden estar en cualquier forma nativa de las proteínas de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En una forma de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en la presente, el término abarca la proteína sin procesar de "longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Una proteína humana de ejemplo útil como antígeno es CD3, particularmente la subunidad épsilon de CD3 (ver UniProt N.º P07766 (versión 185), NCBI RefSeq N.º NP_000724.1,

SEQ ID NO: 40 para la secuencia humana; o UniProt N.º Q95LI5 (versión 69), NCBI GenBank N.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 41 para la secuencia de *Macaca fascicularis*, o GPRC5D (ver UniProt N.º Q9NZD1 (versión 115); NCBI RefSeq N.º NP_061124.1, SEQ ID NO: 45 para la secuencia humana). En ciertas formas de realización, el anticuerpo o la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención se fija a un epítipo de CD3 o GPRC5D que se conserva en los antígenos CD3 o GPRC5D de diferentes especies. En formas de realización particulares, el anticuerpo o la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención se fija a GPRC5D humano.

"Fijación específica" significa que la fijación es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de una porción de fijación al antígeno de fijarse a un determinante antigénico específico se puede medir ya sea mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas conocidas por una persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (analizada, por ejemplo, en un instrumento de BIAcore) (Liljeblad et al., *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de fijación tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). En una forma de realización, el grado de fijación de una porción de fijación al antígeno a una proteína no relacionada es menor de alrededor de 10 % de la fijación de la porción de fijación al antígeno al antígeno según se mide, por ejemplo, mediante SPR. En ciertas formas de realización, una porción de fijación al antígeno que se fija al antígeno, o una molécula de fijación al antígeno que comprende esa porción de fijación al antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de fijación de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su componente de fijación (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, "afinidad de fijación" se refiere a la afinidad de fijación intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de fijación (por ejemplo, una porción de fijación al antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de la molécula X a su componente Y puede representarse en general mediante la constante de disociación (K_D), que es la relación entre las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre y cuando la relación de las constantes de velocidad sea la misma. La afinidad puede medirse mediante métodos establecidos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente. Un método particular para medir

la afinidad es la resonancia de plasmones superficiales (SPR).

"Fijación reducida", por ejemplo, fijación reducida a un receptor Fc, se refiere a una disminución en la afinidad a la interacción respectiva, según se mide, por ejemplo, mediante SPR. A los fines de claridad, el término también incluye la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, supresión completa de la interacción. Por el contrario, "fijación aumentada" se refiere a un aumento en la afinidad de fijación a la interacción respectiva.

Como se usa en la presente, un "antígeno de linfocito T de activación" se refiere a un determinante antigénico expresado en la superficie de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, que es capaz de inducir la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de fijación al antígeno. Específicamente, la interacción de una molécula de fijación al antígeno con un antígeno de linfocito T de activación puede inducir la activación de linfocitos T al desencadenar la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. En una forma de realización particular, el antígeno de linfocito T de activación es CD3, particularmente la subunidad épsilon de CD3 (ver UniProt N.º P07766 (versión 144), NCBI RefSeq N.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 40 para la secuencia humana; o UniProt N.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank N.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 41 para la secuencia de *Macaca fascicularis*).

Como se usa en la presente, "activación de linfocitos T" se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionada de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T se conocen en la técnica y se describen en la presente.

Como se usa en la presente, un "antígeno de célula diana" se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En una forma de realización particular, el antígeno de célula diana es GPRC5D, particularmente GPRC5D humano de acuerdo con SEQ ID NO: 45.

Como se usa en la presente, los términos "primera", "segunda" o "tercera" con respecto a moléculas Fab, etc., se usan a los fines de distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de porción. No se pretende que el uso de estos términos confiera un orden u orientación específica de la molécula de fijación al antígeno biespecífica a menos que se indique

explícitamente.

"Fusionado" significa que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad del dominio Fc) están ligados mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más ligadores peptídicos.

Una "molécula Fab" se refiere a una proteína que consiste en la VH y el dominio CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y la VL y el dominio CL de la cadena liviana (la "cadena liviana de Fab") de una inmunoglobulina.

Una molécula Fab "de entrecruzamiento" (también denominada "Crossfab") se refiere a una molécula Fab en donde los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y liviana de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí), es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena liviana VL y el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 (VL-CH1, en la dirección del terminal N al terminal C), y una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena pesada VH y el dominio constante de la cadena liviana CL (VH-CL, en la dirección del terminal N al terminal C). A los fines de claridad, en una molécula Fab de entrecruzamiento en donde los dominios variables de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena de péptidos que comprende el dominio constante de la cadena pesada 1 CH1 se denomina en la presente la "cadena pesada" de la molécula Fab (de entrecruzamiento). Por el contrario, en una molécula Fab de entrecruzamiento en donde los dominios constantes de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena de péptidos que comprende el dominio variable de la cadena pesada VH se denomina en la presente la "cadena pesada" de la molécula Fab (de entrecruzamiento).

En contraste con lo anterior, una molécula Fab "convencional" significa una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por los dominios variables y constantes de la cadena pesada (VH-CH1, en la dirección del terminal N al terminal C), y una cadena liviana compuesta por los dominios variables y constantes de la cadena liviana (VL-CL, en la dirección del terminal N al terminal C).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas unidas mediante un puente disulfuro. Del

terminal N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también denominado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominados región constante de la cadena pesada. De manera similar, del terminal N al C, cada cadena liviana tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio liviano variable o región variable de la cadena liviana, seguido de un dominio liviano constante (CL), también denominado región constante de la cadena liviana. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena liviana de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en moléculas Fab y un dominio Fc, ligados a través de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en su sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de fijación al antígeno deseada.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos y/o se fijan al mismo epítipo, a excepción de posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, en donde tales variantes generalmente están presente en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen por lo general diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por método alguno en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse a partir de diversas técnicas, que incluyen, entre otras, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fago y métodos que

utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana. Dichos métodos y otros métodos de ejemplo para la elaboración de anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural, es decir, que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación en particular. Por ejemplo, un anticuerpo aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los anticuerpos producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a los fines de la invención, ya que son anticuerpos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado, ya sea de manera parcial o sustancial, mediante cualquier técnica adecuada. Como tales, los anticuerpos y las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la presente invención están aislados. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica hasta más de 95 % o 99 % de pureza según se determina mediante, por ejemplo, métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico). Para obtener una reseña de métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, ver, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera indistinta en la presente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se fija al antígeno al que se fija el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para obtener una reseña de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver Hudson *et al.*, *Nat Med* 9, 129-134 (2003). Para obtener una reseña de fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); ver también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses N.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de fijación al receptor de rescate y que tienen una mayor semivida in vivo, ver la patente estadounidense N.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de fijación al antígeno que pueden ser

bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.248.516 B1). Se pueden elaborar fragmentos de anticuerpos mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

La expresión "dominio de fijación al antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se fija específicamente a parte o la totalidad de un antígeno y que es complementaria a esta. Un dominio de fijación al antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables del anticuerpo (también denominados regiones variables del anticuerpo). Particularmente, un dominio de fijación al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo que está involucrado en la fijación del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen en general estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Ver, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.a ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de fijación al antígeno. Como se usa en la presente en relación a las secuencias de la región variable, "numeración Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Como se usa en la presente, las posiciones de aminoácidos de todos los dominios y regiones constantes de la cadena pesada y liviana están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat descrito en Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.a ed., Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD (1991) y en la presente se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" o "numeración Kabat". Específicamente, el sistema de numeración Kabat (ver páginas 647-660 de Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) se usa para el dominio constante de la cadena liviana CL del isotipo kappa y lambda, y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (ver páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), que en la presente se clarifica adicionalmente al mencionarse como "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat" en este caso.

Como se usa en la presente, la expresión "región hipervariable" o "HVR" se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR"; las CDR de la región/dominio variable de la cadena pesada se abrevian, por ejemplo, como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la región/dominio variable de la cadena liviana se abrevian, por ejemplo, como LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y/o que forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o que contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR de ejemplo en la presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

"Marco" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable que no sean residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable consiste por lo general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen por lo general en el siguiente orden en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos un dominio variable, y por lo general dos, en donde todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Tales dominios variables se denominan en la presente "región variable humanizada". Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, de un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado adicionalmente a partir del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la fijación a C1q y/o la fijación al receptor Fc (FcR).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de fijación al antígeno no humanos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humano deriva de un mamífero transgénico no humano, por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo. En

ciertas formas de realización, un anticuerpo humano deriva de una línea celular de hibridoma. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de colecciones de anticuerpos humanos también se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente.

La "clase" de un anticuerpo o una inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en la presente para definir una región del terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define por lo general para extenderse desde Cys226, o desde Pro230, al terminal carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células huésped también se pueden someter a escisión posterior a la traducción de uno o más, particularmente uno o dos, aminoácidos del terminal C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica la cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en la presente "cadena pesada variante escindida"). Esto también se puede aplicar cuando los dos aminoácidos del terminal C de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Por lo tanto, la lisina (Lys447) del terminal C, o la glicina (Gly446) y lisina (K447) del terminal C, de la región Fc pueden estar presentes o no. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas que incluyen dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc como se define en la presente) se indican en la presente sin el dipéptido de glicina-lisina del terminal C si no se indica lo contrario. En una forma de realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprendida en un anticuerpo o una molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, comprende un dipéptido de glicina-lisina del terminal C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una cadena

pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprendida en un anticuerpo o una molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, comprende un residuo de glicina del terminal C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, comprenden una población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención. La población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida, en donde al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de los anticuerpos o las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas tienen una cadena pesada variante escindida. En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención comprende un anticuerpo o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido de glicina-lisina del terminal C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención comprende un anticuerpo o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del terminal C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, tal composición comprende una población de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que comprende moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del terminal C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido de glicina-lisina del terminal C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante se lleva

a cabo de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.a Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (ver también lo dicho anteriormente). Como se usa en la presente, una "subunidad" de un dominio Fc se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes del terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de autoasociarse de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y un CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación de la cadena principal de péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Como se usa en la presente, una modificación que promueve la asociación incluye particularmente modificaciones separadas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en donde las modificaciones son complementarias entre sí con el fin de promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización se produce entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que pueden no ser idénticas en el sentido de que los componentes adicionales fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, porciones de fijación al antígeno) no son iguales. En algunas formas de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácido. En una forma de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido separada, específicamente una sustitución de aminoácido, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: Fijación a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fijación al receptor Fc, citotoxicidad mediada por

células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígenos, regulación descendiente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en la presente, se considera que las expresiones "diseñar por ingeniería genética, diseñado por ingeniería genética, diseño por ingeniería genética" incluyen cualquier manipulación de la cadena principal de péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de cualquier polipéptido natural o recombinante o fragmento de este. Diseño por ingeniería genética incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos del patrón de glicosilación o del grupo de la cadena lateral de los aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

Como se usa en la presente, se pretende que la expresión "mutación de aminoácido" abarque sustituciones, eliminaciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Se puede llegar a cualquier combinación de sustitución, eliminación, inserción y modificación en el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, fijación reducida a un receptor Fc o asociación aumentada con otro péptido. Las eliminaciones e inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones de aminoácidos en el terminal amino y/o carboxi. Las mutaciones de aminoácidos particulares son sustituciones de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de fijación de una región Fc, se prefieren particularmente las sustituciones de aminoácidos no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo con derivados de aminoácidos no naturales o derivados de aminoácidos naturales de veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones de aminoácidos mediante métodos genéticos o químicos conocidos en la técnica. Los métodos pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles métodos para alterar el grupo de la cadena lateral de un aminoácido mediante métodos que no impliquen diseño por ingeniería genética, tal como modificación química. En la presente se pueden usar diversas designaciones para indicar la misma mutación de aminoácido. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina se puede indicar como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, sin tener en cuenta sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible para el público, tal como el software BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) o el paquete de programas FASTA. Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualesquier algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a los fines de la presente, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos mediante el programa ggsearch del paquete FASTA, versión 36.3.8c o posterior, con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete de programas FASTA fue creado por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; and Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36, y está disponible al público a través de http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Alternativamente, se puede usar un servidor público al que se puede acceder en http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, mediante el uso del programa ggsearch (proteína:proteína global) y las opciones predeterminadas (BLOSUM50; abrir: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se realice una alineación global más que local. El porcentaje de identidad de aminoácido se proporciona en el encabezado de alineación de salida.

El término "polinucleótido" se refiere a un constructo o molécula de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (mARN), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como el que se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualesquier uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Polinucleótido o molécula de ácido nucleico "aislada" se refiere a una molécula de ácido

nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado a los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que normalmente contienen la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de cadenas positivas y negativas, y formas bicatenarias. Los ácidos nucleicos o polinucleótidos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además tales moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, sitio de fijación al ribosoma o un terminador de la transcripción.

"Polinucleótido (o ácido nucleico) aislado que codifica [por ejemplo, un anticuerpo o una molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención]" se refiere a una o más moléculas de polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo (o fragmentos de este), que incluyen tales moléculas de polinucleótidos en un único vector o vectores separados y tales moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Por lo general, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácidos nucleicos a transcribir y un promotor. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende secuencias de polinucleótidos que codifican anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de estos.

El término "vector" o "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al cual está operativamente asociado en una célula. El término incluye el vector como una estructura de ácido

nucleico de autorreplicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se introdujo. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de mRNA estable. Una vez que el vector de expresión se encuentra dentro de la célula, la molécula o proteína de ácido ribonucleico codificada por el gen se produce mediante la maquinaria de transcripción celular y/o traducción. En una forma de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de estos.

Las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera indistinta y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, inclusive la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de estas, independientemente de la cantidad de pases. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de ácido nucleico con respecto a una célula parental, sino que puede contener mutaciones. En la presente se incluyen progenies mutantes que pueden tener la misma función o actividad biológica que se identifica o selecciona en la célula transformada originalmente. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar los anticuerpos o las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células HEK, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

Un "receptor Fc de activación" es un receptor Fc que, tras el acoplamiento por parte de un dominio Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan la célula que porta el receptor a que realice funciones efectoras. Los receptores Fc de activación humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que conlleva a la lisis de células diana recubiertas con anticuerpo por parte de células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las cuales se fijan específicamente anticuerpos o derivados de estos que comprenden una región Fc,

por lo general a través de la parte de la proteína que está en el terminal N con respecto a la región Fc. Como se usa en la presente, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en la cantidad de células diana que se lisan en un momento determinado, en una concentración determinada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, necesario para lograr la lisis de una cantidad determinada de células diana en un momento determinado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción de ADCC es relativa con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, mediante los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar (conocidos por las personas del oficio de nivel medio), pero que no se ha diseñado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción de ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácido que reduce la ADCC es relativa con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácido en el dominio Fc. En la técnica se conocen ensayos adecuados para medir la ADCC (ver, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 2006/082515 o la publicación PCT N.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad necesaria para producir un cambio fisiológico en la célula o el tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o evita efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). Particularmente, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo contenido en su interior sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la composición.

Un "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a un ingrediente

en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico incluye, entre otros, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en la presente, "tratamiento" (y variaciones gramaticales de este, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica para alterar el transcurso natural de una enfermedad en el individuo en tratamiento y se puede realizar ya sea a modo de profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado patológico y la remisión o pronóstico mejorado. En algunas formas de realización, se usan anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "prospecto" se refiere a instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, el tratamiento conjunto, las contraindicaciones y/o las advertencias relacionadas con el uso de tales productos terapéuticos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

La invención proporciona anticuerpos y moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que se fijan a GPRC5D, particularmente GPRC5D humano. Además, las moléculas tienen otras propiedades favorables para la aplicación terapéutica, por ejemplo, con respecto a la eficacia y/o seguridad, así como capacidad de producción.

Anticuerpo contra GPRC5D

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija a GPRC5D, en donde el anticuerpo comprende (i) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID

NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; (ii) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; (iii) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; (iv) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; o (v) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, el anticuerpo comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

En una forma de realización particular, (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 13, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 15, y la VL comprende una secuencia de

aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 48, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 49, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; o (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 57, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; o (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 58, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende (i) una VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o (ii) una VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y una VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o (iii) una VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, y la VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o (iv) la VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 49, y la VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; o (v) la VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 57, y la VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; o (vi) la VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y la VL que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 58, y la VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, particularmente IgG1. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En otra forma de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo de una molécula Fv, una molécula scFv, una molécula Fab y una molécula F(ab')₂. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

En ciertas formas de realización, una secuencia de VH o VL que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia retiene la capacidad de fijarse a GPRC5D. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 13 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 14 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 15 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 16 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 48 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 53 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 49 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 52 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 57 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 64 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 58 y/o un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 63.

En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 13 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 14, inclusive modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 15 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 16, inclusive modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 448 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 53, inclusive modificaciones

posteriores a la traducción de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 49 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 52, inclusive modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 57 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 64, inclusive modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 58 y/o la secuencia de VL en SEQ ID NO: 63, inclusive modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una secuencia de VH seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 12, y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 16.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 15 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 16.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 48 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 53.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 49 y la secuencia de VL de SEQ ID NO:

52.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 57 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 58 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 63.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una región constante humana. En una forma de realización, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que comprende una región constante humana, particularmente una molécula de inmunoglobulina de la clase IgG que comprende un dominio CH1, CH2, CH3 y/o CL humanos. Las secuencias de ejemplo de dominios constantes humanos se proporcionan en SEQ ID NO 37 y 38 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y SEQ ID NO: 39 (dominios constantes de la cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Particularmente, la región constante de la cadena pesada puede comprender mutaciones de aminoácidos en el dominio Fc como se describe en la presente.

En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, particularmente IgG1. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio Fc, particularmente un

dominio Fc de IgG, más particularmente un dominio Fc de IgG1. En una forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. El dominio Fc del anticuerpo puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en la presente en relación con el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención.

En otra forma de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo de una molécula Fv, una molécula scFv, una molécula Fab y una molécula F(ab')₂; particularmente una molécula Fab. En otra forma de realización, el fragmento de anticuerpo es un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo.

En un aspecto adicional, el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, como se describen en las secciones anteriores.

Variantes de glicosilación

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente se altera para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glicosilación en un anticuerpo puede llevarse a cabo de manera conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el oligosacárido unido a esta. Por lo general, los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos comprenden un oligosacárido biantenarico y ramificado generalmente unido mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas formas de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una forma de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen un oligosacárido no fucosilado, es decir, una estructura de oligosacárido que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Tal oligosacárido no fucosilado (también denominado oligosacárido "afucosilado") es particularmente un oligosacárido

ligado a N que carece de un residuo de fucosa unido a la primera GlcNAc en el tallo de la estructura del oligosacárido biantenarico. En una forma de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo nativo o parental. Por ejemplo, la proporción de oligosacáridos no fucosilados puede ser de al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 80 %, o incluso alrededor de 100 % (es decir, no hay presentes oligosacáridos fucosilados). El porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es la cantidad (promedio) de oligosacáridos que carecen de residuos de fucosa con respecto a la suma de todos los oligosacáridos unidos a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en WO 2006/082515, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado alrededor de la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse alrededor de ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Tales anticuerpos que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc pueden tener una fijación al receptor Fc γ RIIIa mejorada y/o una función efectora mejorada, en particular una función de ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, US 2003/0157108; US 2004/0093621.

Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos con fucosilación reducida incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108; y WO 2004/056312, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO *knockout* (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614-622 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107), o células con actividad reducida o abolida de una síntesis de GDP-fucosa o proteína de transporte (ver, por ejemplo, US2004259150, US2005031613, US2004132140, US2004110282).

En una forma de realización adicional, se proporcionan variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se biseca mediante GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada como se describe anteriormente. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en Umana et al., *Nat Biotechnol* 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93,

851-861 (2006); WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener una función de CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

Variantes de anticuerpo diseñadas por ingeniería genética con cisteína

En ciertas formas de realización, se puede desear crear anticuerpos diseñados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otras porciones, tales como porciones farmacológicas o porciones ligador-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente.—Se pueden generar anticuerpos diseñados por ingeniería genética con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.521.541, 8.30.930, 7.855.275, 9.000.130 o WO2016040856.

Derivados de anticuerpos

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente se puede modificar adicionalmente para que contenga porciones no proteináceas adicionales que se conocen en la técnica y que se encuentran fácilmente disponibles. Las porciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, entre otros, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la elaboración debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y, si más de un polímero está unido, pueden ser las mismas moléculas o moléculas

diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse en función de consideraciones que incluyen, entre otras, las funciones o propiedades particulares del anticuerpo a mejorar, si se usará el derivado de anticuerpo en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otra forma de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y una porción no proteinácea que se puede calentar selectivamente mediante exposición a radiación. En una forma de realización, la porción no proteinácea es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier longitud de onda e incluye, entre otras, longitudes de onda que no dañan células comunes, pero que calientan la porción no proteinácea hasta una temperatura a la cual las células cercanas al anticuerpo-porción no proteinácea se inactivan.

Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-GPRC5D como se describe en la presente conjugado (unido químicamente) a uno o más agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o isótopos radioactivos.

En una forma de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente. Por lo general, el anticuerpo se conecta a uno o más de los agentes terapéuticos mediante el uso de ligadores. Una descripción general de la tecnología de ADC que incluye ejemplos de agentes terapéuticos, fármacos y ligadores se expone en *Pharmacol Review* 68:3-19 (2016).

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de esta, que incluye, entre otros, la cadena A de difteria, los fragmentos activos que no son de fijación de la toxina de difteria, la cadena A de etotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abríñ, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa un radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también denominada imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico se pueden elaborar mediante el uso de una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexan-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de fluorina bis-activa (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminpentaacético etiquetado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil al ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente estadounidense N.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en la presente contemplan expresamente, entre otros, tales conjugados preparados con reactivos reticulantes que incluyen, entre otros, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfon)benzoato), que están disponibles en el comercio (por ejemplo, a través de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

Anticuerpos multiespecíficos

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de fijación para al menos dos sitios diferentes, es decir, epítomos diferentes en antígenos diferentes o epítomos diferentes en el mismo antígeno. En ciertas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico tiene tres o más especificidades de fijación. En ciertas formas de realización, una de las especificidades de fijación es para GPRC5D y la otra (dos o más) especificidad es para cualquier otro antígeno. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden fijar a dos (o más) epítomos diferentes de GPRC5D. Los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) se pueden usar para localizar células o agentes citotóxicos a células que expresan GPRC5D. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos incluyen, entre otras, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)) y diseño por ingeniería genética de "botón en ojal" ("knob-in-hole") (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.731.168, y Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270:26 (1997)). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden elaborar mediante diseño por ingeniería genética de efectos de direccionamiento electrostático para elaborar moléculas heterodiméricas Fc de anticuerpos (ver, por ejemplo, WO 2009/089004); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); uso de cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) y WO 2011/034605); uso de la tecnología de cadena liviana para eludir el problema de error de apareamiento de la cadena liviana (ver, por ejemplo, WO 98/50431); uso de la tecnología de "diacuerpo" para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparación de anticuerpo trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética con tres o más sitios de fijación al antígeno, que incluyen, por ejemplo, "anticuerpos Octopus" o DVD-Ig, también se

incluyen en la presente (ver, por ejemplo WO 2001/77342 y WO 2008/024715). Otros ejemplos de anticuerpos multiespecíficos con tres o más sitios de fijación al antígeno se pueden encontrar en WO 2010/115589, WO 2010/112193, WO 2010/136172, WO2010/145792 y WO 2013/026831. El anticuerpo biespecífico o fragmento de fijación al antígeno de este también incluye un "Fab de doble efecto" o "DAF" que comprende un sitio de fijación al antígeno que se fija a GPRC5D así como otro antígeno diferente, o dos epítomos diferentes de GPRC5D (ver, por ejemplo, US 2008/0069820 y WO 2015/095539).

También se pueden proporcionar anticuerpos multiespecíficos de forma asimétrica con un entrecruzamiento de dominios en uno o más brazos de fijación de la misma especificidad del antígeno, es decir, mediante el intercambio de los dominios VH/VL (ver, por ejemplo, WO 2009/080252 y WO 2015/150447), los dominios CH1/CL (ver, por ejemplo, WO 2009/080253) o los brazos de Fab completos (ver, por ejemplo, WO 2009/080251, WO 2016/016299, también ver Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 1187-1191 y Klein et al., MAb 8 (2016) 1010-20). Los brazos de Fab asimétricos también se pueden diseñar por ingeniería genética para introducir mutaciones de aminoácidos cargados o no cargados en interfaces de dominio para dirigir el apareamiento de Fab correcto. Ver, por ejemplo, WO 2016/172485.

En la técnica se conocen diversos formatos moleculares adicionales para anticuerpos multiespecíficos, y estos se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, Spiess et al., Mol Immunol 67 (2015) 95-106).

Un tipo particular de anticuerpos multiespecíficos, también incluidos en la presente, son anticuerpos biespecíficos diseñados para fijarse de manera simultánea a un antígeno superficial en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral, y a un componente invariante de activación del complejo receptor de linfocitos T (TCR), tal como CD3, para redirigir linfocitos T para inactivar células diana. Por lo tanto, en ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, particularmente un anticuerpo biespecífico, en donde una de las especificidades de fijación es para GPRC5D y la otra es para CD3.

Los ejemplos de formatos de anticuerpo biespecífico que pueden ser útiles con este fin incluyen, entre otros, las denominadas moléculas de "BiTE" (captador biespecífico de linfocitos T), en donde dos moléculas de scFv son fusionadas por un ligador flexible (ver, por ejemplo, WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 y WO2008/119567,

Nagorsen y Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)); diacuerpos (Holliger et al., *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) y derivados de estos, tales como diacuerpos en tándem ("TandAb"; Kipriyanov et al., *J Mol Biol* 293, 41-56 (1999)); moléculas de "DART" (redireccionamiento de doble afinidad) que se basan en el formato de diacuerpo, pero presentan un puente disulfuro en el terminal C para una estabilización adicional (Johnson et al., *J Mol Biol* 399, 436-449 (2010)), y los denominados triomab, que son moléculas de IgG de ratón/rata híbridas completas (analizado en Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)). Los formatos de anticuerpo biespecífico de linfocitos T particulares incluidos en la presente se describen en WO 2013/026833, WO2013/026839, WO 2016/020309; Bacac et al., *Oncoimmunology* 5(8) (2016) e1203498.

Moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que se fijan a GPRC5D y un segundo antígeno

La invención también proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, es decir, una molécula de fijación al antígeno que comprende al menos dos porciones de fijación al antígeno capaces de fijarse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos (un primer y un segundo antígeno).

De acuerdo con formas de realización particulares de la invención, las porciones de fijación al antígeno comprendidas en la molécula de fijación al antígeno biespecífica son moléculas Fab (es decir, dominios de fijación al antígeno compuestos por una cadena pesada y una cadena liviana, en donde cada una comprende un dominio variable y un dominio constante). En una forma de realización, la primera y/o la segunda porción de fijación al antígeno son una molécula Fab. En una forma de realización, dicha molécula Fab es humana. En una forma de realización particular, dicha molécula Fab está humanizada. Aun en otra forma de realización, dicha molécula Fab comprende dominios constantes de la cadena pesada y la cadena liviana.

Preferentemente, al menos una de las porciones de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento. Tal modificación reduce el error de apareamiento de las cadenas pesada y liviana de diferentes moléculas Fab, lo que mejora el rendimiento y la pureza de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención en producción recombinante. En una molécula Fab de entrecruzamiento particular útil para la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención, se intercambian los dominios variables de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab (VL y VH, respectivamente). Sin embargo, incluso con este intercambio de dominios, la preparación

de la molécula de fijación al antígeno biespecífica puede comprender ciertos productos secundarios debido a la denominada interacción tipo Bence Jones entre las cadenas pesada y liviana con error de apareamiento (ver Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Para reducir adicionalmente el error de apareamiento de las cadenas pesada y liviana de las diferentes moléculas Fab y, por ende, aumentar la pureza y el rendimiento de la molécula de fijación al antígeno biespecífica deseada, se pueden introducir aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL de las moléculas Fab que se fijan al primer antígeno (GPRC5D) o la molécula Fab que se fija al segundo antígeno (por ejemplo, un antígeno de linfocito T de activación tal como CD3), como se describe adicionalmente en la presente. Las modificaciones de carga se realizan en las moléculas Fab convencionales comprendidas en la molécula de fijación al antígeno biespecífica (tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 1 A-C, G-J), o en las moléculas Fab de entrecruzamiento de VH/VL comprendidas en la molécula de fijación al antígeno biespecífica (tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 1 D-F, K-N) (pero no en ambas). En formas de realización particulares, las modificaciones de carga se realizan en las moléculas Fab convencionales comprendidas en la molécula de fijación al antígeno biespecífica (que, en formas de realización particulares, se fijan al primer antígeno, es decir, GPRC5D).

En una forma de realización particular de acuerdo con la invención, la molécula de fijación al antígeno biespecífica es capaz de fijarse de manera simultánea al primer antígeno (es decir, GPRC5D) y el segundo antígeno (por ejemplo, un antígeno de linfocito T de activación, particularmente CD3). En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica es capaz de reticular un linfocito T y una célula diana al fijarse de manera simultánea a GPRC5D y un antígeno de linfocito T de activación. En una forma de realización incluso más particular, tal fijación simultánea da como resultado la lisis de la célula diana, particularmente una célula tumoral que expresa GPRC5D. En una forma de realización, tal fijación simultánea da como resultado la activación del linfocito T. En otras formas de realización, tal fijación simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionada del grupo que consiste en: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En una forma de realización, la fijación de la molécula de fijación al antígeno biespecífica al antígeno de linfocito T de activación, particularmente CD3, sin fijación simultánea a GPRC5D no da como resultado la activación de linfocitos T.

En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica es capaz de

redirigir la actividad citotóxica de un linfocito T a una célula diana. En una forma de realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por parte de la célula diana y/o especificidad del linfocito T.

Particularmente, un linfocito T de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención es un linfocito T citotóxico. En algunas formas de realización, el linfocito T es un linfocito T CD4⁺ o CD8⁺, particularmente un linfocito T CD8⁺.

Primera porción de fijación al antígeno

La molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende al menos una porción de fijación al antígeno, particularmente una molécula Fab, que se fija a GPRC5D (primer antígeno). En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende dos porciones de fijación al antígeno, particularmente moléculas Fab, que se fijan a GPRC5D. En tal forma de realización particular, cada una de estas porciones de fijación al antígeno se fija al mismo determinante antigénico. En una forma de realización incluso más particular, todas estas porciones de fijación al antígeno son idénticas, es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos, inclusive las mismas sustituciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL como se describe en la presente (si las hubiera). En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende no más de dos porciones de fijación al antígeno, particularmente moléculas Fab, que se fijan a GPRC5D.

En formas de realización particulares, las porciones de fijación al antígeno que se fijan a GPRC5D son una molécula Fab convencional. En tales formas de realización, las porciones de fijación al antígeno que se fijan a un segundo antígeno son una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí.

En formas de realización alternativas, las porciones de fijación al antígeno que se fijan a GPRC5D son una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En tales formas de realización, las porciones de fijación al antígeno que se fijan a un segundo antígeno son una molécula Fab convencional.

La porción de fijación a GPRC5D es capaz de dirigir la molécula de fijación al antígeno biespecífica a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que expresa GPRC5D.

La primera porción de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno biespecífica puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en la presente en relación con el anticuerpo que se fija a GPRC5D, a menos que sea evidente que no es razonable o posible científicamente.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y (b) una segunda

porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica, que comprende (a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región

determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12, y (b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno.

En algunas formas de realización, la primera porción de fijación al antígeno es (o deriva de) un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

En una forma de realización, la VH de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y la VL de la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y la secuencia de VL seleccionada del grupo de

SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 15 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 16.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 48 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 53.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 49 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 52.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 57 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En una forma de realización particular, la primera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 58 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 63. En una

forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una región constante humana. En una forma de realización, la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, particularmente un dominio CH1 y/o CL humano. Las secuencias de ejemplo de dominios constantes humanos se proporcionan en SEQ ID NO 37 y 38 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y SEQ ID NO: 39 (dominios constantes de la cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3). En algunas formas de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. Particularmente, la región constante de la cadena liviana puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga" y/o puede comprender eliminación o sustituciones de uno o más (particularmente dos) aminoácidos del terminal N si se producen en una molécula Fab de entrecruzamiento. En algunas formas de realización, la primera porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Particularmente, la región constante de la cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga".

Segunda porción de fijación al antígeno

La molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende al menos una porción de fijación al antígeno, particularmente una molécula Fab que se fija a un segundo antígeno (diferente de GPRC5D).

En formas de realización particulares, la porción de fijación al antígeno que se fija al segundo antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En tales formas de realización, las porciones de fijación al antígeno que se fijan al primer antígeno (es decir, GPRC5D) son preferentemente una molécula Fab convencional. En formas de realización donde hay más de una porción de fijación al antígeno, particularmente una molécula Fab, que se fija

a GPRC5D comprendido en la molécula de fijación al antígeno biespecífica, la porción de fijación al antígeno que se fija al segundo antígeno es preferentemente una molécula Fab de entrecruzamiento y las porciones de fijación al antígeno que se fijan a GPRC5D son moléculas Fab convencionales.

En formas de realización alternativas, la porción de fijación al antígeno que se fija al segundo antígeno es una molécula Fab convencional. En tales formas de realización, las porciones de fijación al antígeno que se fijan al primer antígeno (es decir, GPRC5D) son una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En formas de realización donde hay más de una porción de fijación al antígeno, particularmente una molécula Fab, que se fija a un segundo antígeno comprendido en la molécula de fijación al antígeno biespecífica, la porción de fijación al antígeno que se fija a GPRC5D es preferentemente una molécula Fab de entrecruzamiento y las porciones de fijación al antígeno que se fijan al segundo antígeno son moléculas Fab convencionales.

En algunas formas de realización, el segundo antígeno es un antígeno de linfocito T de activación (también denominado en la presente "porción de fijación al antígeno de linfocito T de activación o molécula Fab de fijación al antígeno de linfocito T de activación"). En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende no más de una porción de fijación al antígeno capaz de fijarse específicamente a un antígeno de linfocito T de activación. En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica proporciona fijación monovalente al antígeno de linfocito T de activación.

En formas de realización particulares, el segundo antígeno es CD3, particularmente CD3 humano (SEQ ID NO: 40) o CD3 de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 41), con máxima particularidad CD3 humano. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es de reactividad cruzada con (es decir, se fija específicamente a) CD3 humano y de *Macaca fascicularis*. En algunas formas de realización, el segundo antígeno es la subunidad épsilon de CD3 (CD3 épsilon).

En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 29, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 30, una HCDR 3 de SEQ ID NO: 31, una LCDR 1 de SEQ ID NO: 32, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 33 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 34. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al

antígeno comprende una VH que comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 29, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 30 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 31, y una VL que comprende una LCDR 1 de SEQ ID NO: 32, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 33 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 34. En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es (o deriva de) un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la VH de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 35 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 36.

En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99, una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, una LCDR 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una VL que comprende una

LCDR 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103. En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es (o deriva de) un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, y una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, la VH de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 104 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 105.

En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 106, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 107, una HCDR 3 de SEQ ID NO: 108, una LCDR 1 de SEQ ID NO: 109, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 110 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 111. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende una HCDR 1 de SEQ ID NO: 106, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 107 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 108, y una VL que comprende una LCDR 1 de SEQ ID NO: 109, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 110 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 111.

En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es (o deriva de) un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, y una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En una forma de realización, la VH de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, y la VL de la segunda porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 112 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 113.

En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una región constante humana. En una forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, particularmente un dominio CH1 y/o CL humano. Las secuencias de ejemplo de dominios constantes humanos se proporcionan en SEQ ID NO 37 y 38 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y SEQ ID NO: 39 (dominios constantes de la cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3). En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97

%, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. Particularmente, la región constante de la cadena liviana puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga" y/o puede comprender eliminación o sustituciones de uno o más (particularmente dos) aminoácidos del terminal N si se producen en una molécula Fab de entrecruzamiento. En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Particularmente, la región constante de la cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga".

En algunas formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab, en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1, particularmente los dominios variables VL y VH, de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí (es decir, de acuerdo con tal forma de realización, la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en donde se intercambian los dominios variables o constantes de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab). En una forma de realización tal, la primera (y la tercera, si hubiera) porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional.

En una forma de realización, no más de una porción de fijación al antígeno que se fija al segundo antígeno (por ejemplo, un antígeno de linfocito T de activación tal como CD3) está presente en la molécula de fijación al antígeno biespecífica (es decir, la molécula de fijación al antígeno biespecífica proporciona fijación monovalente al segundo antígeno).

Modificaciones de carga

Las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos en moléculas Fab comprendidas en estas que son eficaces para reducir el error de apareamiento de cadenas livianas con cadenas pesadas sin apareamiento (productos secundarios tipo Bence-Jones), que puede ocurrir en la producción de moléculas de fijación al antígeno biespecíficas o multiespecíficas a base de Fab con un intercambio de VH/VL en uno (o más, en el caso de moléculas que

comprenden más de dos moléculas Fab de fijación al antígeno) de sus brazos de fijación (ver también la publicación PCT N.º WO 2015/150447, particularmente los ejemplos en esta, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). La relación de una molécula de fijación al antígeno biespecífica deseada en comparación con productos secundarios no deseados, en particular productos secundarios tipo Bence Jones que se producen en moléculas de fijación al antígeno biespecíficas con un intercambio de dominios VH/VL en uno de sus brazos de fijación, se puede mejorar mediante la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL (a veces denominada en la presente "modificaciones de carga").

Por consiguiente, en algunas formas de realización en donde la primera y la segunda porción de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno biespecífica son ambas moléculas Fab, y en una de las porciones de fijación al antígeno (particularmente la segunda porción de fijación al antígeno), los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí,

i) en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con un aminoácido con carga positiva (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye con un aminoácido con carga negativa (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); o

ii) en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con un aminoácido con carga positiva (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye con un aminoácido con carga negativa (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La molécula de fijación al antígeno biespecífica no comprende ambas modificaciones mencionadas en i) y ii). Los dominios constantes CL y CH1 de la porción de fijación al antígeno que tienen el intercambio de VH/VL no se reemplazan entre sí (es decir, no se intercambian).

En una forma de realización más específica,

i) en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); o

ii) en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización tal, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización adicional, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye

independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización más particular, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización incluso más particular, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En formas de realización particulares, si las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con las formas de realización anteriores se realizan en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno es de isotipo kappa.

Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con las formas de realización anteriores se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno en lugar de en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno. En tales formas de realización particulares, el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno es de isotipo kappa.

Por consiguiente, en una forma de realización, en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye

independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización adicional, en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Aun en otra forma de realización, en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otra forma de realización, en el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y, en el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice

EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que

comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los

dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H)

(numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID

NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12, y

(b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde, en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente con lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en una forma de realización particular, independientemente con lisina (K) o arginina (R)), y, en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno, el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Formatos de molécula de fijación al antígeno biespecífica

Los componentes de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la presente invención se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Las configuraciones de ejemplo se representan en las **Figuras 1A-Z**.

En formas de realización particulares, las porciones de fijación al antígeno comprendidas en la molécula de fijación al antígeno biespecífica son moléculas Fab. En tales formas de realización, la primera, segunda, tercera, etc. porción de fijación al antígeno se pueden denominar en la presente primera, segunda, tercera, etc. molécula Fab, respectivamente.

En una forma de realización, la primera y la segunda porción de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno biespecífica se fusionan entre sí, opcionalmente a través de un ligador peptídico. En formas de realización particulares, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno son una molécula Fab. En una forma de realización tal, la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la

cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno. En otra forma de realización tal, la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno. En formas de realización en donde (i) la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno o (ii) la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno, adicionalmente la cadena liviana de Fab de la primera porción de fijación al antígeno y la cadena liviana de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno se pueden fusionar entre sí, opcionalmente a través de un ligador peptídico.

Es útil una molécula de fijación al antígeno biespecífica con una única porción de fijación al antígeno (tal como una molécula Fab) capaz de fijarse específicamente a un antígeno de célula diana tal como GPRC5D (por ejemplo, como se muestra en las **Figuras 1A, 1D, 1G, 1H, 1K, 1L**), particularmente en casos en los que se espera la internalización del antígeno de célula diana tras la fijación de una porción de fijación al antígeno de afinidad alta. En tales casos, la presencia de más de una porción de fijación al antígeno específica para el antígeno de célula diana puede mejorar la internalización del antígeno de célula diana, lo que reduce su disponibilidad.

Sin embargo, en otros casos, será ventajoso tener una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dos o más porciones de fijación al antígeno (tales como moléculas Fab) específicas para un antígeno de célula diana (ver los ejemplos que se muestran en las **Figuras 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M o 1N**), por ejemplo, para optimizar el direccionamiento a un sitio diana o para permitir la reticulación de los antígenos de célula diana.

Por consiguiente, en formas de realización particulares, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la presente invención comprende una tercera porción de fijación al antígeno.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno se fija al primer antígeno, es decir, GPRC5D. En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno es idéntica a la

primera porción de fijación al antígeno.

La tercera porción de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno biespecífica puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en la presente en relación con la primera porción de fijación al antígeno y/o el anticuerpo que se fija a GPRC5D, a menos que sea evidente que no es razonable o posible científicamente.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR

3 de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 4, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 5, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 6 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 7.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12.

En algunas formas de realización, la tercera porción de fijación al antígeno es (o deriva de) un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, la VH es una VH humanizada y/o la VL es una VL humanizada. En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

En una forma de realización, la VH de la tercera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y la VL de la tercera porción de fijación al antígeno comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y una secuencia de VL que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, y la secuencia de VL seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 15 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 16.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno

comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 48 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 53.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 49 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 52.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 57 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 64.

En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En una forma de realización particular, la tercera porción de fijación al antígeno comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 58 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 63.

En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región constante humana. En una forma de realización, la tercera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, particularmente un dominio CH1 y/o CL humano. Las secuencias de ejemplo de dominios constantes humanos se proporcionan en SEQ ID NO 37 y 38 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y SEQ ID NO: 39 (dominios constantes de la cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3). En algunas formas de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, en particular, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. Particularmente, la región constante de la cadena liviana puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga" y/o puede comprender eliminación o sustituciones de uno o más (particularmente dos) aminoácidos

del terminal N si se producen en una molécula Fab de entrecruzamiento. En algunas formas de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Particularmente, la región constante de la cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en la presente en "modificaciones de carga".

En formas de realización particulares, cada una de la tercera y la primera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab y la tercera porción de fijación al antígeno es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno. Por lo tanto, en estas formas de realización, la primera y la tercera porción de fijación al antígeno comprenden las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y liviana y tienen la misma disposición de dominios (es decir, convencional o de entrecruzamiento)). Además, en estas formas de realización, la tercera porción de fijación al antígeno comprende las mismas sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, de la primera porción de fijación al antígeno. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente como "modificaciones de carga" se realizarán en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de cada una de la primera porción de fijación al antígeno y la tercera porción de fijación al antígeno. Alternativamente, dichas sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda porción de fijación al antígeno (que, en formas de realización particulares, también es una molécula Fab), pero no en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno y la tercera porción de fijación al antígeno.

Al igual que la primera porción de fijación al antígeno, la tercera porción de fijación al antígeno es particularmente una molécula Fab convencional. Sin embargo, también se contemplan formas de realización en donde la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son moléculas Fab de entrecruzamiento (y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional). Por lo tanto, en formas de realización particulares, cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab convencional, y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras formas de realización, cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una

molécula Fab de entrecruzamiento y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional.

Si está presente una tercera porción de fijación al antígeno, en una forma de realización particular, la primera y la tercera porción de fijación al antígeno se fijan a GPRC5D, y la segunda porción de fijación al antígeno se fija a un segundo antígeno, particularmente un antígeno de linfocito T de activación, más particularmente CD3, más particularmente CD3 épsilon.

En formas de realización particulares, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. La primera y la segunda subunidad del dominio Fc son capaces de asociarse de manera estable.

La molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención puede tener diferentes configuraciones, es decir la primera, segunda (y opcionalmente tercera) porción de fijación al antígeno se pueden fusionar entre sí y al dominio Fc de diferentes formas. Los componentes se pueden fusionar entre sí directamente o, preferentemente, a través de uno o más ligadores peptídicos adecuados. Cuando la fusión de una molécula Fab es al terminal N de una subunidad del dominio Fc, por lo general es a través de una región bisagra de inmunoglobulina.

En algunas formas de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En tales formas de realización, la primera porción de fijación al antígeno puede fusionarse en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno o al terminal N de la otra de las subunidades del dominio Fc. En tales formas de realización particulares, dicha primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras de tales formas de realización, dicha primera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una forma de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al

antígeno es una molécula Fab, en donde la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno. En una forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, en donde el dominio Fc está compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1G y 1K (en donde el segundo dominio de fijación al antígeno en estos ejemplos es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL). Opcionalmente, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab y la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En otra forma de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab y cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc. En una forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, en donde el dominio Fc está compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde cada una de la primera y la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1A y 1D (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional). La primera y la segunda molécula Fab pueden fusionarse al dominio Fc directamente o a través de un ligador peptídico. En una forma de realización particular, cada una de la primera y la segunda molécula Fab se fusiona al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una forma de realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁.

En algunas formas de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación

al antígeno es una molécula Fab y la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En tales formas de realización, la segunda porción de fijación al antígeno puede fusionarse en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno o (como se describió anteriormente) al terminal N de la otra de las subunidades del dominio Fc. En tales formas de realización particulares, dicha primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras de tales formas de realización, dicha primera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una forma de realización, cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab, en donde la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno. En una forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, en donde el dominio Fc está compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1H y 1L (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional). Opcionalmente, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab y la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En algunas formas de realización, una tercera porción de fijación al antígeno, particularmente una tercera molécula Fab, se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En tales formas de realización particulares, cada una de dicha primera y tercera moléculas

Fab es una molécula Fab convencional, y la segunda molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento descrita en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras de tales formas de realización, cada una de dicha primera y tercera moléculas Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una de tales formas de realización particulares, cada una de la segunda y la tercera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc, y la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En una forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, en donde el dominio Fc está compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera subunidad del dominio Fc, y en donde la tercera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la segunda subunidad del dominio Fc. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1B y 1E (en estos ejemplos, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab convencional), y las Figuras 1J y 1N (en estos ejemplos, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL). La segunda y la tercera molécula Fab pueden fusionarse al dominio Fc directamente o a través de un ligador peptídico. En una forma de realización particular, cada una de la segunda y la tercera molécula Fab se fusiona al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una forma de realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab y la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En otra de tales formas de realización, cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N

de una de las subunidades del dominio Fc, y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno. En una forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, en donde el dominio Fc está compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la primera subunidad del dominio Fc, y en donde la tercera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la segunda subunidad del dominio Fc. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1C y 1F (en estos ejemplos, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab convencional) y en las Figuras 1I y 1M (en estos ejemplos, en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL). La primera y la tercera molécula Fab pueden fusionarse al dominio Fc directamente o a través de un ligador peptídico. En una forma de realización particular, cada una de la primera y la tercera molécula Fab se fusiona al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una forma de realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, particularmente donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. Opcionalmente, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab y la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En configuraciones de la molécula de fijación al antígeno biespecífica en donde una molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de cada una de las subunidades del dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina, las dos moléculas Fab, las regiones bisagra y el dominio Fc forman esencialmente una molécula de inmunoglobulina. En una forma de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una molécula de la clase IgG. En una forma de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₁. En otra forma de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₄. En una forma de realización particular adicional, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otras formas de realización, la inmunoglobulina es

una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada. En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende una región constante humana, particularmente una región Fc humana.

En algunas de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab y la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab se fusionan entre sí, opcionalmente a través de un ligador peptídico. Según la configuración de la primera y la segunda molécula Fab, la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab puede fusionarse en el terminal C al terminal N de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab, o la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab puede fusionarse en el terminal C al terminal N de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab. La fusión de las cadenas livianas de Fab de la primera y la segunda molécula Fab reduce aún más el error de apareamiento de las cadenas pesada y liviana de Fab sin apareamiento, y también reduce la cantidad de plásmidos necesarios para la expresión de algunas de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención.

Las porciones de fijación al antígeno pueden fusionarse al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un ligador peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, por lo general alrededor de 2-20 aminoácidos. En la técnica se conocen ligadores peptídicos y se los describe en la presente. Los ligadores peptídicos no inmunogénicos y adecuados incluyen, por ejemplo, los ligadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$. "n" es generalmente un número entero de 1 a 10, por lo general de 2 a 4. En una forma de realización, dicho ligador peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en una forma de realización una longitud de 5 a 100, en una forma de realización adicional de 10 a 50 aminoácidos. En una forma de realización, dicho ligador peptídico es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$, en donde G=glucina, S=serina y $(x=3, n= 3, 4, 5 \text{ o } 6, \text{ y } m=0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ o } 5 \text{ y } m= 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, en una forma de realización $x=4$ y $n=2$ o 3, en una forma de realización adicional $x=4$ y $n=2$. En una forma de realización, dicho ligador peptídico es $(G_4S)_2$. Un ligador peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas livianas de Fab de la primera y la segunda molécula Fab entre sí es $(G_4S)_2$. Un ligador peptídico de ejemplo adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo fragmento Fab comprende la secuencia (D)-(G₄S)₂ (SEQ ID NO 43 y 44). Otro de tales ligadores adecuados comprende la secuencia (G₄S)₄. Además, los ligadores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. Particularmente cuando una molécula Fab se fusiona al terminal N de una subunidad del dominio Fc, puede fusionarse a través de una región bisagra de inmunoglobulina o una

porción de esta, con o sin un ligador peptídico adicional.

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$), y un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En ciertas formas de realización, los polipéptidos están ligados covalentemente, por ejemplo, mediante un puente disulfuro.

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$), y un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En ciertas formas de realización, los polipéptidos están ligados covalentemente, por ejemplo, mediante un puente disulfuro.

En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En otras formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$).

En algunas de estas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido de la cadena liviana de Fab de entrecruzamiento de la segunda molécula Fab, en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$), y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En otras de estas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), o un polipéptido en donde el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda

molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), según sea adecuado.

La molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con estas formas de realización puede comprender además (i) un polipéptido de la subunidad del dominio Fc ($CH_2-CH_3(-CH_4)$), o (ii) un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(3)}-CH_{1(3)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). En ciertas formas de realización, los polipéptidos están ligados covalentemente, por ejemplo, mediante un puente disulfuro.

En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH_{1(1)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$). En otras formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH_{1(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH_2-CH_3(-CH_4)$).

En algunas de estas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido de la cadena liviana de Fab de entrecruzamiento de la segunda molécula Fab, en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH_{1(2)}$), y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En otras de estas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno

biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), o un polipéptido en donde el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$), según sea adecuado.

La molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con estas formas de realización puede comprender además (i) un polipéptido de la subunidad del dominio Fc ($CH2-CH3(-CH4)$), o (ii) un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). En ciertas formas de realización, los polipéptidos están ligados covalentemente, por ejemplo, mediante un puente disulfuro.

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica no comprende un dominio Fc. En tales formas de realización particulares, cada una de dicha primera y, si está presente, tercera moléculas Fab es una molécula Fab convencional, y la segunda molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento descrita en la presente, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesada y liviana de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras de tales formas de realización, cada una de dicha primera y, si está presente, tercera moléculas Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una de tales formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda porción de fijación al antígeno, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la primera y la segunda porción de fijación al antígeno son moléculas Fab, y la primera porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1O y 1S (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la

primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional).

En otra de tales formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda porción de fijación al antígeno, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la primera y la segunda porción de fijación al antígeno son moléculas Fab, y la segunda porción de fijación al antígeno se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1P y 1T (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional).

En algunas formas de realización, la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además una tercera porción de fijación al antígeno, particularmente una tercera molécula Fab, en donde dicha tercera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En ciertas de tales formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1Q y 1U (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab convencional), o las Figuras 1X y 1Z (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL).

En algunas formas de realización, la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además una tercera porción de fijación al antígeno, particularmente una tercera molécula Fab, en donde dicha tercera molécula Fab se fusiona en el terminal N de la cadena pesada de

Fab al terminal C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En ciertas de tales formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, y opcionalmente uno o más ligadores peptídicos, en donde la segunda molécula Fab se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el terminal N de la cadena pesada de Fab al terminal C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Tal configuración se representa esquemáticamente en las Figuras 1R y 1V (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL y cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab convencional), o las Figuras 1W y 1Y (en estos ejemplos, en donde el segundo dominio de fijación al antígeno es una molécula Fab convencional, y cada una de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno son una molécula Fab de entrecruzamiento VH/VL).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana) (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del

terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de

acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena pesada) ($VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VH_{(1)}-CL_{(1)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CL_{(2)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VH_{(3)}-CL_{(3)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza

con una región constante de la cadena pesada) ($VH_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(3)}-CL_{(3)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CH1_{(1)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CL_{(2)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CH1_{(3)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena liviana de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región variable de la cadena pesada se reemplaza con una región variable de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(3)}-CH1_{(3)}-VL_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CH1_{(2)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab ($VH_{(1)}-CL_{(1)}$) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CL_{(2)}$). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab ($VH_{(3)}-CL_{(3)}$).

En ciertas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de la

cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región variable de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en donde la región constante de la cadena pesada se reemplaza con una región constante de la cadena liviana), que a su vez comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CH1₍₁₎) y el polipéptido de la cadena liviana de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas formas de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de la cadena liviana de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico del terminal carboxi con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la

cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que

comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y

es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la

cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las

subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la

primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los

dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al

antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se

reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende

a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde

(i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde (i) cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En todas las diferentes configuraciones de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente, si están presentes, pueden estar en los dominios CH1 y CL de la primera y (si está presente) la tercera porción de fijación al antígeno/molécula Fab, o en los dominios CH1 y CL de la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab. Preferentemente, están en los dominios CH1 y CL de la primera y (si está presente) la tercera porción de fijación al antígeno/molécula Fab. De acuerdo con el concepto de la invención, si las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente se realizan en la primera (y, si está presente, la tercera) porción de fijación al antígeno/molécula Fab, no se realizan tales sustituciones de aminoácidos en absoluto en la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab. Por el contrario, si las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente se realizan en la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab, no se realizan tales sustituciones

de aminoácidos en absoluto en la primera (y, si está presente, la tercera) porción de fijación al antígeno/molécula Fab. Se realizan particularmente sustituciones de aminoácidos en moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que comprenden una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH1 de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí.

En formas de realización particulares de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, particularmente en donde las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente se realizan en la primera (y, si está presente, la tercera) porción de fijación al antígeno/molécula Fab, el dominio constante CL de la primera (y, si está presente, la tercera) molécula Fab es del isotipo kappa. En otras formas de realización de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, particularmente en donde las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente se realizan en la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab, el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab es del isotipo kappa. En algunas formas de realización, el dominio constante CL de la primera (y, si está presente, la tercera) porción de fijación al antígeno/molécula Fab y el dominio constante CL de la segunda porción de fijación al antígeno/molécula Fab son del isotipo kappa.

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2

de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de

la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y

una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de

SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende

una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula

Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena

liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de

fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de

SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación

al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de

fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de

fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el

aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la

tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la

complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) una tercera porción de fijación al antígeno que se fija al primer antígeno y es idéntica a la primera porción de fijación al antígeno; y d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde (i) la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o (ii) la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la primera porción de fijación al antígeno en a), y cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la tercera porción de fijación al antígeno en c) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 84 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la

cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 83, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 85 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 86, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 87, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 88 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 89; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de

la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se

sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 91 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 96 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el

índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 90, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 92 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 93, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 94, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 95 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 97; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que

se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 4, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 5 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 6; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En otra forma de realización, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera porción de fijación al antígeno que se fija a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es GPRC5D y la primera porción de fijación al antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 8 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 9, y una región variable de la cadena liviana

(VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 10, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 11 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 12; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es CD3 y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, y en donde la molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID NO: 98, una HCDR 2 de SEQ ID NO: 99 y una HCDR 3 de SEQ ID NO: 100, y una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana (LCDR) 1 de SEQ ID NO: 101, una LCDR 2 de SEQ ID NO: 102 y una LCDR 3 de SEQ ID NO: 103; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde cada una de la primera porción de fijación al antígeno en a) y la segunda porción de fijación al antígeno en b) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, los componentes de la molécula de fijación al antígeno biespecífica (por ejemplo, moléculas Fab, dominio Fc) pueden fusionarse directamente o a través de diversos ligadores, particularmente ligadores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, por lo general alrededor de 2-20 aminoácidos, que se describen en la presente o se conocen en la técnica. Los ligadores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, ligadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en donde n es generalmente un número entero de 1 a 10, por lo general de 2 a 4.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab

(convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una región

variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de

acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno

biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula

Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende a) una primera y una tercera porción de fijación al antígeno que se fijan a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es GPRC5D y en donde cada una de la primera y la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; b) una segunda porción de fijación al antígeno que se fija a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde la segunda porción de fijación al antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena liviana de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad; en donde en el dominio constante CL de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye con lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye con lisina (K) o arginina (R)

(numeración de acuerdo con Kabat) (más particularmente con arginina (R)), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera y la tercera porción de fijación al antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye con ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y en donde además la primera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de la cadena pesada de Fab de la segunda porción de fijación al antígeno en b), y cada una de la segunda porción de fijación al antígeno en b) y la tercera porción de fijación al antígeno en a) se fusiona en el terminal C de la cadena pesada de Fab al terminal N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En una forma de realización de acuerdo con este aspecto de la invención, en la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y, en la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V) y, opcionalmente, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización adicional de acuerdo con este aspecto de la invención, en la primera subunidad del dominio Fc y de manera adicional, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza con un residuo de cisteína (E356C) (particularmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína), y, en la segunda subunidad del dominio Fc y de manera adicional, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización de acuerdo con este aspecto de la invención, en cada una de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de leucina en la posición 234 se reemplaza con un residuo de alanina (L234A), el residuo de leucina en la posición 235 se reemplaza con un residuo de alanina (L235A) y el residuo de prolina en la posición 329 se reemplaza con un residuo de glicina (P329G) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización de acuerdo con este aspecto de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana.

En una forma de realización específica particular, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 17, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 18, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 19, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 20. En una forma de realización específica particular adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 21, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 22, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 23, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 24. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 114, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 115, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 116, y un polipéptido que comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 117. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 118, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 119, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 120, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 121. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 122, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 123, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 124, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 125. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 126, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 127, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 128, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 129. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

En otra forma de realización específica, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 130, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 131, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 132, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 133. En una forma de realización específica adicional, la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133.

Dominio Fc

En formas de realización particulares, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. Se entiende que las características del dominio Fc descritas en la presente en relación con la molécula de fijación al antígeno biespecífica pueden aplicarse igualmente a un dominio Fc comprendido en un anticuerpo de la invención.

El dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica consiste en un par de cadenas de polipéptidos que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, cuyas subunidades comprenden los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociación estable entre sí. En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En una forma de realización, el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica es un dominio Fc de IgG. En una forma de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En una forma de realización más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución de aminoácido en la posición S228 (numeración del índice EU de Kabat), particularmente la sustitución de aminoácido S228P. Esta sustitución de aminoácido reduce el intercambio de brazo Fab *in vivo* de anticuerpos IgG₄ (ver Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En una forma de realización particular adicional, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una forma de realización incluso más particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁ humana. Una secuencia de ejemplo de una región Fc de IgG₁ humana se proporciona en SEQ ID NO: 42.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de acuerdo con la invención comprenden diferentes porciones de fijación al antígeno, que pueden fusionarse a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc, por lo que las dos subunidades del dominio Fc están generalmente comprendidas en dos cadenas de polipéptidos no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización conducen a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de moléculas de fijación al antígeno biespecíficas en la producción recombinante, será por ende ventajoso introducir en el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, en formas de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más amplia entre las dos subunidades de un dominio Fc

de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, en una forma de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

Existen varios enfoques de modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para forzar la heterodimerización, los cuales se describen, por ejemplo, en WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Por lo general, en todos estos enfoques, tanto el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc como el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se diseñan por ingeniería genética de manera complementaria para que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) no pueda ya homodimerizarse consigo mismo sino que se vea forzado a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 diseñado por ingeniería genética de manera complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimericen y no se formen homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos enfoques diferentes para una mejor heterodimerización de la cadena pesada se contemplan como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-liviana (por ejemplo, intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de fijación y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfaz CH1/CL) en la molécula de fijación al antígeno biespecífica que reducen los errores de apareamiento de la cadena pesada/liviana y los productos secundarios de tipo Bence Jones.

En una forma de realización específica, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc es una modificación denominada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Por lo general, el método implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfaz de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen al reemplazar las pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por

ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido al reemplazar las grandes cadenas laterales de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

Por consiguiente, en una forma de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, lo que genera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y, en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, lo cual genera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la cual es posicionable la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

Preferentemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad pueden crearse al alterar el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica del sitio, o mediante síntesis de péptidos.

En una forma de realización específica, en (el dominio CH3 de) la primera subunidad del dominio Fc (la subunidad de "botones"), el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y, en (el dominio CH3 de) la segunda subunidad del dominio Fc (la subunidad de "botón"), el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V). En una forma de realización, en la segunda subunidad del dominio Fc y de manera adicional, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, en la primera subunidad del dominio Fc y de manera adicional, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza con un residuo de cisteína (E356C) (particularmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína), y, en la segunda subunidad del dominio Fc y de manera adicional, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, lo cual estabiliza aún más el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En una forma de realización particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A y Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, la porción de fijación al antígeno que se fija al segundo antígeno (por ejemplo, antígeno de linfocito T de activación) se fusiona (opcionalmente mediante la primera porción de fijación al antígeno, que se fija a GPRC5D, y/o un ligador peptídico) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación de "botón"). Sin desear limitarse a la teoría, la fusión de la porción de fijación al antígeno que fija un segundo antígeno, tal como un antígeno de linfocito T de activación, a la subunidad que contiene botón del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de moléculas de fijación al antígeno que comprenden dos porciones de fijación al antígeno que se fijan a un antígeno de linfocito T de activación (choque estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

Otras técnicas de modificación de CH3 para forzar la heterodimerización se contemplan como alternativas de acuerdo con la invención y se describen, por ejemplo, en WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en EP 1870459. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones específicas de aminoácidos en la interfaz de dominio CH3/CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc. Una forma de realización

preferida para la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención son las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en uno de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otra forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende la mutación de aminoácido T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, y de manera adicional las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otra forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende las mutaciones de aminoácidos S354C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, o dicha molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos S354C, T366S, L368A, Y407V en los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y de manera adicional las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2013/157953. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido L351D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización adicional, el primer dominio CH3 comprende además la mutación de aminoácido L351K. En una forma de realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además una mutación de aminoácido seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2012/058768. En una forma de realización, un primer dominio CH3

comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A y K409F. En una forma de realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende una mutación de aminoácido adicional en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo, seleccionada de a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R o S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V o F405W, e) N390R, N390K o N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización adicional, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366V y K409F. En una forma de realización adicional, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A y K409F. En una forma de realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones de aminoácidos K392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se utiliza de manera alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2011/143545, por ejemplo, con la modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se utiliza de manera alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2011/090762, que también utiliza la tecnología de botones en ojales descrita anteriormente. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366W y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407A. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407T (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica o su dominio Fc es de la subclase IgG₂ y se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2010/129304.

En una forma de realización alternativa, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media los efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, como se describe en la

publicación PCT WO 2009/089004. Por lo general, este método implica el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc con residuos de aminoácidos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelva electrostáticamente desfavorable y la heterodimerización se vuelva electrostáticamente favorable. En una forma de realización tal, un primer dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácidos de K392 o N392 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido con carga positiva (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K, y con mayor preferencia D399K y E356K). En una forma de realización adicional, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución de aminoácidos de K409 o R409 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferentemente K409D o R409D). En una forma de realización adicional, el primer dominio CH3 comprende adicional o alternativamente la sustitución de aminoácidos de K439 y/o K370 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2007/147901. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos D239K, E240K y K292D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, se puede usar alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2007/110205.

En una forma de realización, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos K392D y K409D, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos D356K y D399K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc que reducen la fijación al receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc le confiere a la molécula de fijación al antígeno biespecífica (o el anticuerpo) propiedades farmacocinéticas favorables, que incluyen una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación favorable de

distribución en tejido-sangre. Al mismo tiempo, puede, no obstante, conducir a un direccionamiento indeseable de la molécula de fijación al antígeno biespecífica (o el anticuerpo) a células que expresan receptores Fc en lugar de a las células portadoras de antígeno preferidas. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor Fc puede conducir a una liberación de citocinas que, en combinación con las propiedades de activación de linfocitos T (por ejemplo, en formas de realización de la molécula de fijación al antígeno biespecífica en donde la segunda porción de fijación al antígeno se fija a un antígeno de linfocito T de activación) y la larga semivida de la molécula de fijación al antígeno biespecífica, da como resultado una activación excesiva de los receptores de citocinas y graves efectos secundarios tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras de receptor Fc) que no sean linfocitos T puede incluso reducir la eficacia de la molécula de fijación al antígeno biespecífica (particularmente una molécula de fijación al antígeno biespecífica en donde la segunda porción de fijación al antígeno se fija a un antígeno de linfocito T de activación) debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por parte de las células NK.

Por consiguiente, en formas de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención exhibe una afinidad de fijación reducida con un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En una forma de realización tal, el dominio Fc (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) exhibe menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, con mayor preferencia menos de 10 % y con máxima preferencia menos de 5 % de la afinidad de fijación a un receptor Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa), y/o menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, con mayor preferencia menos de 10 % y con máxima preferencia menos de 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa). En una forma de realización, el dominio Fc (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) no se fija sustancialmente a un receptor Fc y/o induce una función efectora. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fc γ humano de activación, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, con máxima especificidad Fc γ RIIIa humano. En una forma de realización, la

función efectora es una o más seleccionadas del grupo de CDC, ADCC, ADCCP y secreción de citocinas. En una forma de realización particular, la función efectora es ADCC. En una forma de realización, el dominio Fc presenta una afinidad de fijación sustancialmente similar al receptor Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. Una fijación a FcRn sustancialmente similar se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de alrededor de 70 %, particularmente más de alrededor de 80 %, más particularmente más de alrededor de 90 % de la afinidad de fijación de un dominio Fc de IgG₁ nativa (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa) con FcRn.

En ciertas formas de realización, el dominio Fc se diseña por ingeniería genética para tener una afinidad de fijación reducida con un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no diseñado por ingeniería genética. En formas de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de fijación del dominio Fc con un receptor Fc y/o la función efectora. Por lo general, la misma una o más mutaciones de aminoácidos están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una forma de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de fijación del dominio Fc con un receptor Fc. En una forma de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de fijación del dominio Fc con un receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En formas de realización donde hay más de una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de fijación del dominio Fc con el receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de fijación del dominio Fc con un receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En una forma de realización, la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc diseñado por ingeniería genética exhibe menos de 20 %, particularmente menos de 10 %, más particularmente menos de 5 % de la afinidad de fijación con un receptor Fc en comparación con una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc no diseñado por ingeniería genética. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fc γ humano de activación, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, con máxima especificidad Fc γ RIIIa humano. Preferentemente, la fijación a cada uno de estos

receptores está reducida. En algunas formas de realización, la afinidad de fijación con un componente del complemento, específicamente la afinidad de fijación con C1q, también está reducida. En una forma de realización, la afinidad de fijación con el receptor Fc neonatal (FcRn) no está reducida. Una fijación a FcRn sustancialmente similar, es decir, preservación de la afinidad de fijación del dominio Fc con dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de alrededor de 70 % de la afinidad de fijación de una forma no diseñada por ingeniería genética del dominio Fc (o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende dicha forma no diseñada por ingeniería genética del dominio Fc) con FcRn. El dominio Fc o las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención que comprenden dicho dominio Fc pueden exhibir más de alrededor de 80 % e incluso más de alrededor de 90 % de tal afinidad. En ciertas formas de realización, el dominio Fc de la molécula de fijación al antígeno biespecífica se diseña por ingeniería genética para tener una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no diseñado por ingeniería genética. La función efectora reducida puede incluir, entre otras, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción reducida de citocinas, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario reducida por parte de células presentadoras de antígenos, fijación reducida a células NK, fijación reducida a macrófagos, fijación reducida a monocitos, fijación reducida a células polimorfonucleares, señalización directa que induce la apoptosis reducida, reticulación reducida de anticuerpos fijados a la diana, maduración reducida de células dendríticas o cebado reducido de linfocitos T. En una forma de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción reducida de citocinas. En una forma de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una forma de realización, la ADCC reducida es menos de 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no diseñado por ingeniería genética (o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc no diseñado por ingeniería genética).

En una forma de realización, la mutación de aminoácido que reduce la afinidad de fijación del dominio Fc con un receptor Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácido. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización

más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En algunas formas de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329. En una forma de realización más específica, la sustitución de aminoácido es P329A o P329G, particularmente P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329 y una sustitución de aminoácido adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización más específica, la sustitución de aminoácido adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En formas de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En formas de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", "PGLALA" o "LALAPG"). Específicamente, en formas de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), es decir, en cada una de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de leucina en la posición 234 se reemplaza con un residuo de alanina (L234A), el residuo de leucina en la posición 235 se reemplaza con un residuo de alanina (L235A) y el residuo de prolina en la posición 329 se reemplaza con un residuo de glicina (P329G) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones de aminoácidos suprime casi por completo la fijación al receptor Fcγ (así como el complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. WO 2012/130831 también describe métodos para preparar tales dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como la fijación al receptor Fc o las funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ exhiben una afinidad de fijación reducida con receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con los anticuerpos IgG₁. Por lo tanto, en

algunas formas de realización, el dominio Fc de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención es un dominio Fc de IgG₄, particularmente un dominio Fc de IgG₄ humana. En una forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en la posición S228, específicamente la sustitución de aminoácido S228P (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Para reducir aún más su afinidad de fijación con un receptor Fc y/o su función efectora, en una forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición L235, específicamente la sustitución de aminoácido L235E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otra forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329, específicamente la sustitución de aminoácido P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Tales mutantes de dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de fijación al receptor Fc γ se describen en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

En una forma de realización particular, el dominio Fc que exhibe una afinidad de fijación reducida con un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y opcionalmente P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En ciertas formas de realización, se ha eliminado la N-glicosilación del dominio Fc. En una forma de realización tal, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácido en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácido que reemplaza asparagina con alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en la presente y en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, los dominios Fc con fijación al receptor Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense N.º 6.737.056) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de

aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, inclusive el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente estadounidense N.º 7.332.581).

Se pueden preparar mutaciones de dominios Fc mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos, con métodos genéticos o químicos conocidos en la técnica. Los métodos pueden incluir mutagénesis específica del sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Por ejemplo, los cambios correctos de nucleótidos pueden verificarse mediante secuenciación.

La fijación a los receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA, o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) con instrumentos estándar, tales como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Alternativamente, se puede evaluar la afinidad de fijación de los dominios Fc o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc con receptores Fc mediante el uso de líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

Se puede medir la función efectora de un dominio Fc, o una molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc, mediante métodos conocidos en la técnica. Se describen ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente estadounidense N.º 5.500.362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente estadounidense N.º 5.821.337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radioactivo (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Natural Killer (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas formas de realización, la fijación del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q, está reducida. Por consiguiente, en algunas formas de realización en donde el dominio Fc está diseñado por ingeniería genética para

tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de fijación a C1q para determinar si el dominio Fc, o la molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende el dominio Fc, es capaz de fijarse a C1q y tiene por ende actividad de CDC. Ver, por ejemplo, el ELISA de fijación a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol Methods* 202, 163 (1996); Cragg et al., *Blood* 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, *Blood* 103, 2738-2743 (2004)).

También se pueden realizar determinaciones de fijación a FcRn y semivida/depuración *in vivo* mediante métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929).

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente o un fragmento de estos. En algunas formas de realización, dicho fragmento es un fragmento de fijación al antígeno.

Los polinucleótidos que codifican anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden expresarse como un solo polinucleótido que codifica todo el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se expresan conjuntamente. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se expresan conjuntamente pueden asociarse a través de, por ejemplo, puentes disulfuro u otros medios para formar un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena liviana de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica puede ser codificada por un polinucleótido separado de la porción del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende la cadena pesada del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica. Cuando se expresan conjuntamente, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena liviana para formar el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica. En otro ejemplo, la porción del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una o más moléculas Fab podría ser codificada por un polinucleótido separado de la porción del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica que comprende la otra de las

dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una molécula Fab. Cuando se expresan conjuntamente, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunas formas de realización, el polinucleótido aislado codifica todo el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención como se describe en la presente. En otras formas de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención como se describe en la presente.

En ciertas formas de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras formas de realización, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (mARN). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Se pueden obtener anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención mediante, por ejemplo, síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aíslan uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (fragmento), por ejemplo, descrito anteriormente, y se los inserta en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Tal polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales. En una forma de realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (fragmento) junto con señales adecuadas de control de la transcripción/traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., *Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido o virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el

anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (fragmento) (es decir, la región codificante en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en la presente, "una región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Si bien un "codón de detención" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualesquier secuencias flanqueantes, por ejemplo, promotores, sitios de fijación al ribosoma, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en un solo constructo de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en constructos de polinucleótidos separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de manera posterior a la traducción o en conjunto con esta en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Asimismo, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas con un polinucleótido que codifica el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (fragmento) de la invención, o variante o derivado de este. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, entre otros, elementos o motivos especializados, tal como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras a fin de colocar la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con esta) están "asociados operativamente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del mRNA que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad de transcripción de la plantilla de ADN. Por lo tanto, una región promotora estaría asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fue capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido

para dirigir la transcripción específica de células. En la presente se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, entre otras, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, entre otras, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con intrón-A), el virus del simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovino y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Otras regiones de control de la transcripción adecuadas incluyen potenciadores y promotores específicos de tejidos, así como promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclinas inducibles por promotores). De manera similar, las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, entre otros, sitios de fijación al ribosoma, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión puede incluir también otras características tales como un origen de replicación, y/o elementos de integración de cromosomas tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales, o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, el ADN que codifica una secuencia de señales puede colocarse corriente arriba del ácido nucleico que codifica un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención o un fragmento de este. De acuerdo con la hipótesis de señales, las proteínas segregadas por las células de mamífero tienen un péptido de señal o una secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez iniciada la exportación de la cadena proteica en crecimiento a lo largo del retículo endoplasmático rugoso. Las personas del oficio de nivel medio son conscientes de que los polipéptidos segregados por las células de vertebrado tienen por lo general un péptido de señal fusionado al terminal N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma segregada o "madura" del polipéptido. En ciertas formas de

realización, se utiliza el péptido de señal nativo, por ejemplo, un péptido de señal de la cadena pesada o la cadena liviana de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con aquel. Alternativamente, se puede usar un péptido de señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional de este. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder de activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón.

Se puede incluir ADN que codifica una secuencia de proteínas corta que podría usarse para facilitar una purificación posterior (por ejemplo, una etiqueta de histidina) o ayudar a etiquetar el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica dentro de o en los extremos del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (fragmento) que codifica el polinucleótido.

En una forma de realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En ciertas formas de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en la presente en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una forma de realización tal, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican (parte de) un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención. Como se usa en la presente, el término "célula huésped" se refiere a cualquier clase de sistema celular que se puede diseñar por ingeniería genética para generar el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención o fragmentos de este. En la técnica se conocen células huésped adecuadas para replicar y soportar la expresión de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas. Tales células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vector para la siembra de fermentadores a gran escala a fin de obtener cantidades suficientes del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, particularmente cuando no se necesita glicosilación. Luego de la expresión, el polipéptido se aísla de la pasta de célula bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar

adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, que incluyen cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se "humanizaron", lo que dio como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), y Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glicosilados) también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar junto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden usar cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o linfocitos 293T como se describen, por ejemplo, en Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI (como se describen, por ejemplo, en Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO dhfr (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para obtener una reseña de ciertas líneas de células huésped de mamífero que son adecuadas para la producción de proteínas, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ), páginas 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta

transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En una forma de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

En la técnica se conocen tecnologías estándar para expresar genes extraños en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende ya sea la cadena pesada o la cadena liviana de un dominio de fijación al antígeno tal como un anticuerpo pueden diseñarse por ingeniería genética para también expresar la otra de las cadenas del anticuerpo, de modo que el producto expresado sea un anticuerpo que tenga tanto una cadena pesada como una cadena liviana.

En una forma de realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, como se proporciona en la presente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, y recuperar opcionalmente el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Los componentes de la molécula de fijación al antígeno biespecífica (o el anticuerpo) de la invención se pueden funcionar entre sí mediante ingeniería genética. La molécula de fijación al antígeno biespecífica puede diseñarse de modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o lo hagan indirectamente mediante una secuencia ligadora. La composición y la longitud del ligador pueden determinarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden evaluarse para determinar su eficacia. En la presente se proporcionan ejemplos de secuencias ligadoras entre componentes diferentes de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión a fin de separar los componentes individuales de la fusión si así se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa.

El anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención comprende por lo general al menos una región variable de anticuerpo capaz de fijarse a un determinante antigénico. Regiones variables pueden formar parte y derivar de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de estos. En la técnica se conocen

métodos para producir anticuerpos y anticuerpos monoclonales (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Se pueden construir anticuerpos no naturales mediante síntesis de péptidos en fase sólida, se los puede producir de manera recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 4.186.567) o se los puede obtener, por ejemplo, mediante el cribado de colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas livianas variables (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.969.108 de McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de fijación al antígeno o región variable en el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, dominios de fijación al antígeno o regiones variables no limitativos útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, primate o humano. Si el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica es para uso humano, se puede usar una forma quimérica del anticuerpo, en donde las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.565.332 de Winter). La humanización puede lograrse mediante diversos métodos que incluyen, entre otros, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones constantes o de marco humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de residuos de marco fundamentales (por ejemplo, los que son importantes para retener buenas funciones de anticuerpo o afinidad de fijación al antígeno), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos fundamentales para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones constantes y de marco humanas, o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, aunque "cubriéndolos" con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de los residuos superficiales. Se analizan anticuerpos humanizados y métodos para elaborarlos, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se los describe adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes estadounidenses N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de una región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "resurgimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la "transposición de FR"); Y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) Y

Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" de la transposición de FR). Las regiones de marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, entre otras: regiones de marco seleccionadas mediante el método de "mejor ajuste" (ver, por ejemplo, Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)); regiones de marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena liviana o pesada (ver, por ejemplo, Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol*, 151:2623 (1993)); regiones de marco maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones de marco de línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones de marco derivadas del cribado de colecciones de FR (ver, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Se pueden producir anticuerpos humanos mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos de forma general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Se pueden preparar anticuerpos humanos al administrar un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Por lo general, tales animales contienen la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de manera extracromosómica o integrados de manera aleatoria en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, y en líneas generales, los locus de inmunoglobulina endógena se han inactivado. Para una reseña de los métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Ver también, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense N.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense N.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden producir anticuerpos humanos mediante métodos a base de hibridomas. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por

ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) También se describen anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (es decir, la tecnología Trioma) se describe también en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos al aislarlos de colecciones de anticuerpos humanos, como se describe en la presente.

Se pueden aislar anticuerpos útiles en la invención al cribar colecciones combinatorias en búsqueda de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Se analizan métodos para el cribado de colecciones combinatorias, por ejemplo, en Lerner *et al.* en *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para generar colecciones de expresión en fago y cribar tales colecciones en búsqueda de anticuerpos que posean las características de fijación deseadas. Tales métodos se analizan, por ejemplo, en Frenzel *et al.* en *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan *et al.* en *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) y Zhao *et al.* en *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016), así como en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y en Marks y Bradbury en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

En ciertos métodos de expresión en fago, se clonan por separado repertorios de genes VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que pueden luego cribarse en búsqueda de fago de fijación al antígeno como se describe en Winter *et al.* en *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). El fago presenta por lo general fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, se puede clonar

el repertorio sin tratamiento previo (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una sola fuente de anticuerpos contra un amplio rango de no autoantígenos y también autoantígenos sin inmunización alguna, como describen Griffiths *et al.* en *EMBO Journal* 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden elaborar de manera sintética colecciones sin tratamiento previo al clonar segmentos de genes V sin redistribución a partir de células madre, y al usar cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la redistribución *in vitro*, como lo describen Hoogenboom y Winter en *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones en fago de anticuerpos humano incluyen, por ejemplo: las patentes estadounidenses N.º 5.750.373; 7.985.840; 7.785.903 y 8.679.490, así como las publicaciones de patente estadounidense N.º 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 y 2007/0292936. Otros ejemplos de métodos conocidos en la técnica para el cribado de colecciones combinatorias en búsqueda de anticuerpos con una actividad o actividades deseadas incluyen la expresión de ribosomas y mRNA, así como métodos para la expresión y selección de anticuerpos en bacterias, células de mamífero, células de insecto o células de levadura. Se analizan métodos para la expresión superficial en levadura, por ejemplo, en Scholler *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012) y en Cherf *et al.* en *Methods in Molecular biology* 1319:155-175 (2015), así como en Zhao *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012). Se describen métodos para la expresión de ribosomas, por ejemplo, en *Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997) y en Hanes *et al.* en *PNAS* 94:4937-4942 (1997).

Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas preparados como se describe en la presente pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales utilizadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, etc., y resultarán evidentes para las personas del oficio de nivel medio. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad, se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se fija el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica. Por ejemplo, para la purificación mediante cromatografía de afinidad de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar cromatografía de afinidad de Proteína A o G y cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar un

anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica esencialmente como se describe en los Ejemplos. La pureza del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica puede determinarse con cualquiera de una variedad de métodos analíticos conocidos, incluso electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares.

Ensayos

Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas proporcionados en la presente pueden identificarse, cribarse o caracterizarse en función de sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica con un receptor Fc o un antígeno diana puede determinarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), con instrumentos estándar tales como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como las que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Alternativamente, la fijación de anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas a diferentes receptores o antígenos diana puede evaluarse mediante el uso de líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). A continuación se describe una forma de realización ilustrativa y de ejemplo específica para medir la afinidad de fijación.

De acuerdo con una forma de realización, K_D se mide mediante resonancia de plasmones superficiales con una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre la porción Fc y los receptores Fc, el receptor Fc recombinante etiquetado con His es capturado por un anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) inmovilizado en chips CM5 y los constructos biespecíficos se usan como analitos. Sucintamente, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-Penta-His se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, hasta 40 µg/ml antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección del ligando, se

inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Posteriormente, el receptor Fc se captura durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de cuatro veces del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica (rango entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05 % de tensioactivo P20, pH 7,4) a 25 °C a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad con el antígeno diana, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas son capturados por un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que está inmovilizado en una superficie de chip sensor CM5 activado como se describe al respecto del anticuerpo anti-Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 RU. Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Los antígenos diana se pasan a través de las celdas de flujo durante 180 s a un rango de concentración de 250 a 1000 nM con una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se monitorea la disociación durante 180 s.

Se corrigen las diferencias del índice de refracción volumétrico al sustraer la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Se utilizó la respuesta en estado estacionario para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de fijación de Langmuir. Las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) se calculan mediante un modelo de fijación de Langmuir simple uno a uno (BIACORE® T100 Evaluation Software versión 1.1.1) al fijar de manera simultánea los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación (K_D) de equilibrio se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

La actividad biológica de las moléculas de fijación al antígeno biespecíficas (o anticuerpos) de la invención puede medirse mediante diversos ensayos descritos en los Ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de la proliferación de linfocitos T, la inducción de la señalización en linfocitos T, la inducción de la expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T, la inducción de la lisis de células diana, tales como células tumorales, y la inducción de la regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas proporcionados en la presente, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos que figuran más adelante. En una forma de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas proporcionados en la presente y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En otra forma de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

También se proporciona un método para producir un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención en una forma adecuada para la administración in vivo, en donde el método comprende (a) obtener un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la invención, y (b) formular el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica con al menos un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, con lo cual una preparación de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica se formula para la administración in vivo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica disuelta o dispersada en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. La frase "aceptable desde el punto de vista farmacéutico o farmacológico" se refiere a composiciones y entidades moleculares que son en general no tóxicas para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o inadecuada en algún otro sentido cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. Las personas del oficio de nivel medio conocerán la preparación de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica y opcionalmente un ingrediente activo adicional a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.a ed. Mack Printing Company, 1990, que se incorpora en la presente por referencia. Además, para la administración en animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA (FDA Office of Biological Standards) o las

autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferidas son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en la presente, "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos los solventes, amortiguadores, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de estos, como sabría una persona del oficio de nivel medio (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.a ed. Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329, que se incorpora en la presente por referencia). Excepto en el caso de que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Un inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluso administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, parcialmente en función de si la administración es breve o crónica.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para la administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en amortiguadores compatibles desde el punto de vista fisiológico, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o amortiguador de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención en la cantidad necesaria en el solvente adecuado con una variedad de los

demás ingredientes mencionados a continuación, según sea necesario. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido filtrado anteriormente de manera estéril de aquel. El medio líquido debe amortiguarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe primero volverse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se observará que la contaminación de endotoxinas debe mantenerse como mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, de menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico adecuados incluyen, entre otros: amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener compuestos que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de

ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración farmacológica (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En formas de realización particulares, se puede lograr la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina y combinaciones de estos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, de manera subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden elaborarse mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional con el uso de uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares aceptables desde el punto de vista fisiológico que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas pueden formularse en una composición en un ácido o base libre, forma neutra o de sal. Las sales aceptables

desde el punto de vista farmacéutico son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o las que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También se pueden derivar sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Composiciones y métodos terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas proporcionados en la presente puede usarse en métodos terapéuticos. Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden usarse como agente inmunoterapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de tipos de cáncer.

Para su uso en métodos terapéuticos, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una forma conforme a una buena práctica médica. Algunos factores que se consideran en este contexto son el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención para su uso en un método de tratamiento. En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al

individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. En formas de realización adicionales, la invención proporciona un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica como se describe en la presente para su uso en la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica para su uso en un método de inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica para inducir la lisis de una célula diana. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" es un mamífero, preferentemente un ser humano. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es una enfermedad autoinmunitaria, particularmente lupus eritematoso sistémico y/o artritis reumatoide. La producción de autoanticuerpos patógenos por parte de células plasmáticas autorreactivas es una de las características distintivas de las enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, se puede usar GPRC5D para el direccionamiento a células plasmáticas autorreactivas en enfermedades autoinmunitarias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención en la elaboración o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una forma de realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En una forma de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. En una forma de realización adicional, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En aun otra forma de realización, el medicamento es para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana,

particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad. En una forma de realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene tal enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención. En una forma de realización, se administra una composición a dicho individuo, la cual comprende el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En una forma de realización, el método comprende poner en contacto una célula diana con un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención en presencia de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico. En un aspecto adicional, se proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo. En una forma de realización tal, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica para inducir la lisis de una célula diana. En una forma de realización, un "individuo" es un ser humano.

En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Los ejemplos no limitativos de tipos de cáncer incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer hematológico, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que pueden tratarse con un anticuerpo o molécula de fijación al

antígeno biespecífica de la presente invención incluyen, entre otros, neoplasias ubicadas en el: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, región torácica y sistema genitourinario. También se incluyen lesiones o afecciones precancerosas y metástasis de cáncer. En ciertas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de próstata. En una forma de realización, el cáncer es cáncer de próstata. Una persona del oficio de nivel medio reconoce fácilmente que, en muchos casos, el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica puede no proporcionar una cura sino tan solo un beneficio parcial. En algunas formas de realización, un cambio fisiológico que tenga algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una cantidad de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica que proporcione un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es por lo general un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunas formas de realización, una cantidad eficaz de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención se administra a una célula. En otras formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención se administra a un individuo para el tratamiento de la enfermedad.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica se administra con fines preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, los antecedentes médicos del paciente y la respuesta al anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, así como el criterio del médico a cargo. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de los ingredientes activos en una composición y dosis adecuadas para el sujeto individual. En la presente se contemplan diversos

cronogramas de dosificación que incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples en diversos puntos temporales, la administración por bolo y la infusión por impulso.

El anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica se administra adecuadamente al paciente en un momento o a lo largo de una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg – 10 mg/kg) de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, según la afección, el tratamiento se sostendría por lo general hasta que se produzca una inhibición deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica estaría en el rango de alrededor de 0,005 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender de alrededor de 1 microgramo/kg de peso corporal, alrededor de 5 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 10 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 50 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 100 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 200 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 350 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 500 microgramos/kg de peso corporal, alrededor de 1 miligramo/kg de peso corporal, alrededor de 5 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 10 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 50 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 100 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 200 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 350 miligramos/kg de peso corporal, alrededor de 500 miligramos/kg de peso corporal, a alrededor de 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier rango comprendido en estos. En los ejemplos no limitativos de un rango derivable de las cantidades enumeradas en la presente, se puede administrar un rango de alrededor de 5 mg/kg de peso corporal a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 5 microgramos/kg de peso corporal a alrededor de 500 miligramos/kg de peso corporal, etc. en función de las cantidades descritas anteriormente. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Tales dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, o, por ejemplo,

alrededor de seis dosis del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica). Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosis. El progreso de este tratamiento se monitorea fácilmente con técnicas y ensayos convencionales.

Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención se usarán por lo general en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención, o las composiciones farmacéuticas de estos, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Las personas del oficio de nivel medio tienen la capacidad de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en la presente.

Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Se puede formular luego una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en circulación que incluya la IC_{50} determinada en el cultivo celular. Se puede usar tal información para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, mediante técnicas conocidas en la técnica. Una persona del oficio de nivel medio podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en función de los datos en animales.

La cantidad y el intervalo de dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosis para pacientes habituales para la administración mediante inyección varían de alrededor de 0,1 a 50 mg/kg/día, por lo general de alrededor de 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles en plasma terapéuticamente eficaces al administrar múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC.

En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Una persona del oficio de nivel medio será capaz de optimizar dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación indebida.

Una dosis terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas descritos en la presente proporcionará por lo general un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para 50 % de una población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas que exhiben grandes índices terapéuticos. En una forma de realización, el anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de acuerdo con la presente invención exhibe un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un rango de dosis adecuado para su uso en seres humanos. La dosis se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango en función de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosis empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto y similares. El médico puede seleccionar la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en vista de la afección del paciente (ver, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, p. 1, incorporado en la presente por referencia en su totalidad).

El médico de pacientes tratados con anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico a cargo también sabría ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (mientras no haya toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección a tratar, con la vía de administración y similares. Por ejemplo, la gravedad de la afección puede evaluarse parcialmente mediante métodos estándar de evaluación pronóstica. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis variarán también de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Los anticuerpos y moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por

ejemplo, un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o una enfermedad en un individuo que necesite tal tratamiento. Tal agente terapéutico adicional puede comprender cualesquier ingredientes activos adecuados para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a los inductores de la apoptosis. En una forma de realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de la topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de la quinasa, un antagonista del receptor, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico.

Tales otras moléculas están adecuadamente presentes de forma conjunta en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad utilizada de anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecífica se usan por lo general en las mismas dosis y con las vías de administración descritas en la presente, o de alrededor de 1 a 99 % de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía que se determine adecuada de manera empírica/clínica.

Tales tratamientos conjuntos indicados anteriormente abarcan la administración conjunta (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención puede ocurrir antes de, simultáneamente con y/o después de la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional. Los anticuerpos o moléculas de fijación al antígeno biespecíficas de la invención también pueden usarse en combinación con radioterapia.

Artículos de elaboración

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos

descritos anteriormente. El artículo de elaboración comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz, por sí misma o en combinación con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. Además, el artículo de elaboración puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende un anticuerpo o molécula de fijación al antígeno biespecífica de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de algún otro modo. El artículo de elaboración en esta forma de realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Alternativa o adicionalmente, el artículo de elaboración puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde los puntos de vista comercial y del usuario, incluso otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-GPRC5D proporcionados en la presente es útil para detectar la presencia de GPRC5D en una muestra biológica. Como se usa en la presente, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como un tejido de próstata.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-GPRC5D para usar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de GPRC5D en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-GPRC5D descrito en la presente en condiciones que permiten la fijación

del anticuerpo anti-GPRC5D a GPRC5D, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-GPRC5D y GPRC5D. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, se utiliza un anticuerpo anti-GPRC5D para seleccionar sujetos elegibles para el tratamiento con un anticuerpo anti-GPRC5D, por ejemplo, donde GPRC5D es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse con un anticuerpo de la invención incluyen cáncer, particularmente mieloma múltiple.

En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-GPRC5D etiquetados. Las etiquetas incluyen, entre otras, etiquetas o porciones que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromóforas, densas en electrones, quimioluminiscentes y radioactivas), así como porciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las etiquetas de ejemplo incluyen, entre otras, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas giratorias, etiquetas de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo (10B10) que se fija a GPRC5D que comprende una región de la cadena pesada variable (VL), en donde la VL puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 81. El anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena liviana (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 82. El anticuerpo puede comprender una VH y una VL, en donde la VL puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 81 y en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 82. Preferentemente,

el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo (10B10-TCB). El anticuerpo puede comprender una primera cadena liviana, en donde la primera cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 67. El anticuerpo puede comprender una segunda cadena liviana, en donde la segunda cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 68. El anticuerpo puede comprender una primera cadena pesada, en donde la primera cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 69. El anticuerpo puede comprender una segunda cadena pesada, en donde la segunda cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 70. En una forma de realización preferida, el anticuerpo comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

Secuencias de aminoácidos

	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
5E11-VH-HCDR1	GFTFSKYAMA	1
5E11-VH-HCDR2	STGGVNTYYRDSVKA	2
5E11-VH-HCDR3	HTGDYFDY	3
5E11-VL-LCDR1	ASQSVSISGINLMN	4
5E11-VL-LCDR2	HASILAS	5
5E11-VL-LCDR3	QQTRESPLT	6

5F11-VH-HCDR1	GFSFSNYGMA	7
5F11-VH-HCDR2	STGGGNTYYRDSVKG	8
5F11-VH-HCDR3	HDRGGLY	9
5F11-VL-LCDR1	RSSKSLHSHNGITYVY	10
5F11-VL-LCDR2	RMSNLAS	11
5F11-VL-LCDR3	GQLLENPYT	12
5E11-VH	ELQLEQSGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNANTQ YLQMDSLRS EDTATYYCATHTGDYFDYWGQGVMVTVSS	13
5E11-VL	DIVLTQSPALAVSPGQRATISCRASQSVSISGINLMNWYQQ KPGQQPKLLIYHASILASGIPTRFSGSGSGTDFTLTIDPVQA DDIATYYCQQTRESPLTFGSGTNLEIK	14
5F11-VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAATKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFIVSRDNANTQ QYLQMDSLRS EDTATYYCTRHD RGGLYWGQGVMVTVSS	15
5F11-VL	DIVMTQAPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHSHNGITYVYVY FQKPGKSPQVLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSETDFTLKIS RVEAEDVGIYHCGQLLENPYTFGAGTELELK	16
5E11-TCB-LC1(GPR C5D)	DIVLTQSPALAVSPGQRATISCRASQSVSISGINLMNWYQQ KPGQQPKLLIYHASILASGIPTRFSGSGSGTDFTLTIDPVQA DDIATYYCQQTRESPLTFGSGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	17
5E11-TCB-LC2(CD3)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	18
5E11-TCB-HC ojal	ELQLEQSGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNANTQ YLQMDSLRS EDTATYYCATHTGDYFDYWGQGVMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG	19

	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	
5E11- TCB-HC botón	ELQLEQSGGGLVQPGGSLTSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNANTQ YLQMDSLRS EDTATYYCATHTGDYFDYWGQGMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
5F11- TCB- LC1(GPR C5D)	DIVMTQAPLSVSVTPGESASISCRSSKSLLSNGITYVYWY FQKPGKSPQVLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSETDFTLKIS RVEAEDVGIYHCGQLLENPYTFGAGTELELKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	21
5F11- TCB- LC2(CD3)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL ISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
5F11- TCB-HC ojal	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAATKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFIVSRDNANT QYLQMDSLRS EDTATYYCTRHDRGGLYWGQGMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	23
5F11- TCB-HC	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAATKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFIVSRDNANT	24

botón	QYLQMDSLRS EDTATYYCTRHDRGGLYWGGQVMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
ET150-5- TCB- LC1(GPR C5D)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNVGGNYVFWYQQ VPGATPKLLIYRSNQRPSGVPDRFAGSKSGSSASLAISGL RSEDEADYYCATWDDSLSGFVFGTGTKVTVLGQPKAAP VTLFPPSSKKLQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	25
ET150-5- TCB- LC2(CD3)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	26
ET150-5- TCB-HC ojal	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYGKAYDQWGQGTTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	27
ET150-5- TCB-HC botón	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGYGKAYDQWGQGTTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQA FRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	28

	VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
CD3-VH- HCDR1	TYAMN	29
CD3-VH- HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	30
CD3-VH- HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	31
CD3-LH- LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
CD3-LH- LCDR2	GTNKRAP	33
CD3-LH- LCDR3	ALWYSNLWV	34
CD3-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS	35
CD3-VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	36
Dominio CL kappa humano	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	37
Dominio CL lambda humano	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	38
Región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (CH1- CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSP	39
hCD3	MQSGTHWRVVLGCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKV SISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDE	40

	DHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVC ENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYWSKNRKAKAK PVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDIPIRKGQRDL YSGLNQRRRI	
cynoCD3	MQSGTRWRVLGLCLLSIGVWGQDGNEEMGSITQTPYQVS ISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFS EMEQSGYYVCYPRGSPEDASHHLYLKARVCENCMEMD VMAVATIVIVDICITLGLLLLVEYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQGRGQNKERPPVPNPDIPIRKGGQDLYSGLNQRRRI	41
Región Fc de hlgG1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHENHNHYTQKSLSLSP	42
Ligador	GGGGSGGGGS	43
Ligador	DGGGGSGGGGS	44
GPRC5D humano	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILESLAILGIVVTILLLLAF LFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSVLGLFGLAFAFIILNQ QTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRCVFSFSW TTILCIAIGCSLLQIIATEYVTLMITRGMMFVNMTPCQLNVD FVLLVYVLFMLALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRILFITV LFSIIWVWVISMILLRGNPQFQRQPQWDDPVVICALVTNA WVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPVTAHQHSFQ VENQELSRARDSDGAEEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECF IPQAKLSPQQDAGGV	45
5E11_VH1 a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS	46
5E11_VH1 b	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS	47
5E11_VH1 c	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS	48
5E11_VH1 d	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS	49
5E11_VL1 a	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSISGINLMNWWYQ QKPGQPKLLIYHASILASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTREIK	50
5E11_VL1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSISGINLMNWWYQ QKPGQPKLLIYHASILASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL	51

c	QAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	
5E11_VL2 a	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPRLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	52
5E11_VL2 b	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	53
5E11_VL3 a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVSISGINLMNWY QQKPGKQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	54
5E11_VL3 b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVSISGINLMNWY QQKPGQQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	55
5F11_VH1 a	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS S	56
5F11_VH1 b	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS S	57
5F11_VH1 c	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS	58
5F11_VH1 d	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN AKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS	59
5F11_VH2 b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS S	60
5F11_VH2 d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN AKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS	61
5F11_VL1 a	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYVYWY LQKPGQSPQVLIYRMSNLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	62
5F11_VL1 b	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYVYWY LQKPGKSPQVLIYRMSNLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	63

5F11_VL2 a	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYVYVWY LQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVIHCGQLLENPYTFGGGTKLEIK	64
5F11_VL2 b	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSLLSHNGITYVYVWY QQKPGQPPKLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYHCGQLLENPYTFGGGTKLEIK	65
5F11_VL2 c	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASKSLLSHNGITYVYVWY QQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYHCGQLLENPYTFGGGTKLEIK	66
10B10 TCB_LC1	DIQLTQSPHSLSASLGETVSI ECLASEGISNYLAWFHQKPG KSPQLLIYYASSLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISNMQPE DEGVYYCQQGYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNREGC	67
10B10 TCB_LC2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	68
10B10 TCB_HC(ojal de Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSAASGFTFTNFYMAWVR QAPTKALEWVASINTGGGYTYRDSVKGRFTVSRDNTRS TLYLQMDSLRSEETATYYCARHLTYGRYYYFDYWGGGV MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	69
10B10 TCB_HC(botón de Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSAASGFTFTNFYMAWVR QAPTKALEWVASINTGGGYTYRDSVKGRFTVSRDNTRS TLYLQMDSLRSEETATYYCARHLTYGRYYYFDYWGGGV MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGG SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV	70

	SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
07A04 IgG_LC	DVQMTQSPYNLAASPGESVSINCKASKSISKYLAWYQQKP GKANKLLIYDGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPE DFGLYYCQQHNEYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNREGC	71
07A04 IgG_HC	QVTLKESGPGILQPSHTLSLTCSFSGFSLSTYGMGVNWIR QPSGKGLEWLASIWWNGNTYNNPSLKSRLTVSKDTSNNQ AFLKVTSDTADTATYYCVHTRGIIRGRGLFFDYWGQGV VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	72
B72- TCB_HC1	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL VQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	73
B72- TCB_LC1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	74
B72- TCB_HC2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYNSTNYAQKLQGRVTMTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT	75

	TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
B72-TCB_LC2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSRVFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	76
BCMA-TCB-HC1 (ojal)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAITASGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	77
BCMA-TCB-LC1	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSAYYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYERWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	78
BCMA-TCB-HC2 (botón)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAITASGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSQAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	79
BCMA-TCB-LC2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL	80

	TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
10B10_VH	DIQLTQSPHLSASLGETVSIECLASEGISNYLAWFHQKPG KSPQLLIYYASSLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISNMQPE DEGVYYCQQGYKYPLTFGSGTKLEIK	81
10B10_VL	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFTNFYMAWVR QAPTKALEWVASINTGGGYTYRDSVKGRFTVSRDNTRS TLYLQMDSLRSEETATYYCARHLTYYGRIYYFDYWGQGV MVTVSS	82
5E11_P1A E5706_PA RENT-VH- HCDR1	GFTFSKYAMA	83
5E11_P1A E5706_PA RENT-VH- HCDR2	SISTGGVNTYYRDSVKA	84
5E11_P1A E5723_P1 AE5728_V H-HCDR2	SISTGGVNTYYADSVKG	85
5E11_P1A E5706_PA RENT-VH- HCDR3	HTGDYFDY	86
5E11_P1A E5706_PA RENT-VL- LCDR1	RASQSVSISGINLMN	87
5E11_P1A E5706_PA RENT-VL- LCDR2	HASILAS	88
5E11_P1A E5706_PA RENT-VL- LCDR3	QQTRESPLT	89
5F11_P1A E5733_PA RENT-VH- HCDR1	GFSFSNYGMA	90
5F11_P1A E5733_PA RENT-VH-	SISTGGGNTYYRDSVKG	91

HCDR2		
PF11_P1A E5745_VL -HCDR2	SISTGGGNTYYADSVKG	92
5F11_P1A E5733_PA RENT-VH- HCDR3	HDRGGLY	93
5F11_P1A E5733_PA RENT-VL- LCDR1	RSSKSLLHSNGITYVY	94
5F11_P1A E5733_PA RENT-VL- LCDR2	RMSNLAS	95
5F11_P1A E5741_VL _LCDR2	RMSNRAS	96
5F11_P1A E5733_PA RENT-VL- LCDR3	GQLENPYT	97
CD3-CI22- VH- HCDR1	SYAMN	98
CD3-CI22- VH- HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	99
CD3-CI22- VH- HCDR3	HTTFPSSYVSYYGY	100
CD3-CI22- VH- LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	101
CD3-CI22- VH- LCDR2	GTNKRAP	102
CD3-CI22- VH- LCDR3	ALWYSNLWV	103

CD3-CI22-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVR QA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQGT LVTVSS	104
CD3-CI22-VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ E KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGA Q PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	105
CD3-V9-VH-HCDR1	GYSFTGYTMN	106
CD3-V9-VH-HCDR2	LINPYKGVSTYNQKFKD	107
CD3-V9-VH-HCDR3	SGYYGDS DWYFDV	108
CD3-V9-VH-LCDR1	RASQDIRNYLN	109
CD3-V9-VH-LCDR2	YTSRLES	110
CD3-V9-VH-LCDR3	QQGNTLPWT	111
CD3-V9-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVR QAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGT LVTVSS	112
CD3-V9-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI	113
5F11(VH1b + VL2a)-CI22-TCB-LC1(antiG	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHSHNGITYVYWY LQKPGQSPQQLIYRMSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQS	114

PRC5D) (P1AE662 3)	GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	
5F11(VH1 b + VL2a)- CI22-TCB- LC2(antiC D3) (P1AE662 3)	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASG FQFSSYAMNWVR QAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	115
5F11(VH1 b + VL2a)- CI22-TCB- HC1(ojal de Fc) (P1AE662 3)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	116
5F11(VH1 b + VL2a)- CI22-TCB- HC2(botón de Fc) (P1AE662 3)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPG QAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	117
5F11(VH1 c+VL1b)- CI22-TCB- LC1(antiG PRC5D)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYVYWY LQKPGKSPQVLIYRMSNLASGV PDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVG VYHCGQLLENPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV	118

(P1AE662 4)	THQGLSSPVTKSFNRGEC	
5F11(VH1 c+VL1b)- CI22-TCB- LC2(antiC D3) (P1AE662 4)	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASG FQSSYAMNWVR QAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	119
5F11(VH1 c+VL1b)- CI22-TCB- HC1(ojal de Fc) (P1AE662 4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	120
5F11(VH1 c+VL1b)- CI22-TCB- HC2(botón de Fc) (P1AE662 4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPED EA EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	121
5E11(VH1 c+VL2b)- CI22-TCB- LC1(antiG PRC5D) (P1AE662)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	122

5)		
5E11(VH1 c+VL2b)- CI22-TCB- LC2(antiC D3) (P1AE662 5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFQSSYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIISKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	123
5E11(VH1 c+VL2b)- CI22-TCB- HC1(ojal de Fc) (P1AE662 5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	124
5E11(VH1 c+VL2b)- CI22-TCB- HC2(botón de Fc) (P1AE662 5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSGQAVT QEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	125
5E11(VH1 d+VL2a)- CI22-TCB- LC1(antiG PRC5D) (P1AE662 6)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPRLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	126

5E11(VH1 d+VL2a)- CI22-TCB- LC2(antiC D3) (P1AE662 6)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFQSSYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIISKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL TLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	127
5E11(VH1 d+VL2a)- CI22-TCB- HC1(ojal de Fc) (P1AE662 6)	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNANKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	128
5E11(VH1 d+VL2a)- CI22-TCB- HC2(botón de Fc) (P1AE662 6)	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNANKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSGQAVVT QEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	129
5F11(VH1 c+VL1b)- V9-TCB- LC1(antiG PRC5D) (P1AF133 6)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYVYWY LQKPGKSPQVLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	130
5F11(VH1 c+VL1b)- V9-TCB- LC2(antiC D3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVR QAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGT LTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL	131

(P1AF1336)	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
5F11(VH1c+VL1b)-V9-TCB-HC1(ojal de Fc) (P1AF1336)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	132
5F11(VH1c+VL1b)-V9-TCB-HC2(botón de Fc) (P1AF1336)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY YCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	133

Ejemplos

A continuación, se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Cabe destacar que diversas otras formas de realización pueden ponerse en práctica, en función de la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1

Expresión de dianas tumorales

Para identificar los genes diferenciales expresados por el mieloma múltiple en comparación con las células plasmáticas normales, se realizó ARNseq para 10 muestras

derivadas de pacientes con mieloma múltiple (MM) y 10 células plasmáticas (PC) derivadas de médula ósea de donantes sanos. El ARN se extrajo con el microkit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se retiró con el set de DNasa libre de RNasa (Qiagen) durante la extracción de ARN. La calidad del ARN extraído se controló en Agilent Eukaryote Total RNA Pico Chips (Agilent Technologies). Se utilizó el kit de ARN ultra bajo SMARTer para la secuenciación de Illumina (Clontech) para preparar y amplificar cADN de 1,6 ng de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, 1 ng de cADN amplificado se sometió a preparación de colecciones Nextera XT (Illumina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron colecciones de secuenciación con el kit de cuantificación de colecciones Kapa (Kapa Biosystems) y se controló su calidad mediante electroforesis capilar en un bioanalizador con el uso de chips de alta sensibilidad (Agilent Technologies). Las colecciones se secuenciaron en un secuenciador HiSeq2500 (Illumina) durante 2 x 50 ciclos mediante kits de generación de cúmulos versión 4 y reactivos de secuenciación versión 4 (Illumina).

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) es una proteína de la superficie celular, que se expresa en células plasmáticas malignas y por ende se reconoce como diana de mieloma múltiple (Tai YT y Anderson KC, Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma, Immunotherapy. Noviembre de 2015; 7(11): 1187–1199). Con la tecnología de ARNseq, un análisis profundo indicó que GPRC5D se expresa tanto como BCMA en células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple (Figura 2). Con mayor importancia, la expresión diferencial de GPRC5D entre células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple y células plasmáticas sanas es de aproximadamente 20 veces. Por el contrario, la expresión diferencial de BCMA entre células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple y células plasmáticas sanas es de solo 2 veces. La expresión general de GPRC5D es mucho mayor que la expresión de otras moléculas diana de mieloma múltiple conocidas, tales como SLAMF7, CD138 y CD38. Además, los linfocitos B de memoria o indiferenciados sanos apenas expresan GPRC5D.

Ejemplo 2

Generación de aglutinantes de GPRC5D y preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB)

Se generaron aglutinantes de GPRC5D mediante inmunización de ADN de ratas, seguida de generación de hibridomas, cribado y secuenciación de hibridomas. El cribado para una

fijación específica se midió mediante ELISA en función de su fijación a transfectante que expresa GPRC5D. Se identificaron dos aglutinantes de GPRC5D, denominados 5E11 (SEQ ID NO: 13 y 14) y 5F11 (SEQ ID NO: 15 y 16) en adelante. Una vez identificados los aglutinantes específicos, las IgG se convirtieron en anticuerpos biespecíficos de linfocitos T. Los principios de convertir aglutinantes en anticuerpos biespecíficos de linfocitos T se ejemplifican y describen en la técnica, por ejemplo, en la publicación PCT N.º WO 2014/131712 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T comprenden dos porciones de fijación a GPRC5D y una porción de fijación a CD3 (anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-GPRC5D/anti-CD3) como se muestra en la Figura 3. Se prepararon los siguientes anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-GPRC5D/anti-CD3: i) 5E11-TCB (SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20); ii) 5F11-TCB (SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24); iii) ET150-5-TCB (SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28); iv) B72-TCB (SEQ ID NO: 73, 74, 75 y 76); y v) BCMA-TCB (SEQ ID NO: 77, 78, 79 y 80). La porción de fijación a GPRC5D ET150-5 se describe en la publicación PCT N.º WO 2016/090329A2. El término "ET-150-5" se utiliza como sinónimo del término "ET150-5" en la presente, y viceversa. Se preparó DP47-TCB no dirigido como control negativo. DP47-TCB es un anticuerpo biespecífico de linfocitos T no dirigido, que se fija solo a CD3 y no a GPRC5D. DP47-TCB se describe en la publicación PCT N.º WO 2014/131712 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El B72-TCB deriva del anticuerpo contra GCDB72 divulgado en la Tabla 23 de WO 2018/0117786 A2 y comprende la porción de fijación a GPRC5D de GCDB72. B72-TCB se generó en el formato 1+1 crossmab (SEQ ID NO: 73, 74, 75 y 76). El BCMA-TCB deriva de WO 2016/166629 A1 y comprende la porción de fijación a GPRC5D de A02_Rd4_6nM_C01 allí divulgada. BCMA-TCB se generó en el formato 2+1 crossmab (SEQ ID NO: 77, 78, 79 y 80).

Ejemplo 3

Fijación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T a líneas celulares de mieloma múltiple

Para medir la fijación a GPRC5D, se realizó un ensayo de fijación basado en FACS en líneas celulares de mieloma múltiple informadas (Lombardi et al., Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease; Genes Chromosomes Cancer. 2007 Mar;46(3):226-38.). Las líneas celulares AMO-1, L363 y OPM-2 se cultivaron en RPMI 1640 + medio Glutamax (Gibco) complementado con 20 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco)

inactivado por calor y 1 % de penicilina - estreptomicina 100X (Gibco). La línea celular WSU-DLCL2 (control negativo) se cultivó con el mismo medio complementado con solo 10 % de FBS. Las líneas celulares NCI-H929 y RPMI-8226 también se cultivaron con el mismo medio complementado con mercaptoetanol 50 μ M (Gibco) y piruvato de sodio 1 mM (Gibco). Las líneas celulares se cultivaron en matraces de 75 cm² (TPP) con dos pasadas por semana.

Se evaluó la fijación de diferentes anticuerpos TCB anti-GPRC5D humano (5E11-TCB, 5F11-TCB y ET150-5 TCB) con una tinción indirecta. Las células se incubaron con los constructos de TCB anti-GPRC5D humano 5E11-TCB, 5F11-TCB o ET150-5 TCB en el rango de 10 μ g/ml a 0,00064 μ g/ml mediante dilución en serie con un factor de 0,2, o sin constructo en 100 μ l de solución salina amortiguada con fosfato (PBS; Gibco) durante 1 hora a 4 °C. Las células se tiñeron con tinte azul vivo (Life Technologies) diluido a 1:800 en PBS durante 20 min a 4 °C antes de la tinción con anticuerpo específico de fragmento Fcy anti-IgG humana de cabra conjugado con PE (Jackson Laboratories) diluido a 1/300 en amortiguador de tinción de citometría de flujo (eBioscience) incubado durante 30 min a 4 °C. Se realizó una adquisición de citometría de flujo en un BD Biosciences Fortessa de diseño personalizado y se la analizó con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) y el software GraphPad Prism.

Las Figuras 4A-C muestran que tanto 5E11-TCB como 5F11-TCB se fijan a todas las líneas celulares de mieloma múltiple evaluadas de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, ET150-5-TCB se fija de manera mucho más débil a las líneas celulares evaluadas. No se observó fijación a las células WSU-DLCL2 (líneas celulares GPRC5D⁻ de linfoma no Hodgkin) por parte de los TCB anti-GPRC5D.

Ejemplo 4

Citotoxicidad de linfocitos T mediada por TCB anti-GPRC5D

Para medir la funcionalidad de los anticuerpos TCB anti-GPRC5D, se realizó un ensayo *in vitro* de citotoxicidad de linfocitos T. Sucintamente, las líneas celulares AMO-1, L363 y OPM-2 se cultivaron en RPMI 1640 + medio Glutamax (Gibco) complementado con 20 % de suero bovino fetal (FBS; Gibco) inactivado por calor y 1 % de penicilina - estreptomicina 100X (PS; Gibco). La línea celular WSU-DLCL2 se cultivó con el mismo medio complementado con solo 10 % de FBS. Las líneas celulares NCI-H929 y RPMI-8226 se cultivaron con el mismo medio complementado con mercaptoetanol 50 μ M (Gibco) y piruvato de sodio 1 mM (Gibco). Las líneas celulares se cultivaron en un matraz

de 75 cm² (TPP) con dos pasadas por semana.

Las líneas celulares se cocultivaron a una relación diana:efector de 1:10 con 3,105 linfocitos T alógenos aislados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (capa leucocítica de Blutspende Schlieren) con un kit de aislamiento de linfocitos T Pan humanos (Miltenyi Biotec) en medio IMDM (Gibco) complementado con 10 % de FBS (Gibco) + 1 % de PS (Gibco). Se agregaron anticuerpos TCB anti-GPRC5D humano (5E11-TCB, 5F11-TCB, ET150-5 TCB o DP47-TCB) al cocultivo a una concentración diferente, en el rango de 1 µg/ml a 0,000001 µg/ml con dilución en serie de factor 0,1 o 0 µg/ml. Después de 20 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, 75 µl de sobrenadante por cavidad se transfirieron a una placa blanca de 96 cavidades (Greiner bio-one) con 25 µl por cavidad de ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo (Promega). Se realizó una adquisición de luminiscencia en el PerkinElmer EnVision después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y se la analizó con los softwares GraphPad Prism y XL fit. Los datos se grafican como la señal de luminiscencia para la liberación de LDH.

Las Figuras 5A-E muestran que tanto 5E11-TCB como 5F11-TCB mediaron una fuerte citotoxicidad de linfocitos T en las líneas celulares de mieloma múltiple, particularmente NCI-H929 (Figura 5B), RPMI-8226 (Figura 5C), L363 y (Figura 5D) AMO-1 (Figura 5A), mientras que no se observó inactivación en la línea de control negativo WSU-DLCL2 (Figura 5E). Por el contrario, ET150-5-TCB medió poca inactivación o una inactivación significativamente menor en las líneas celulares de mieloma múltiple evaluadas. La Tabla 1 resume los valores de EC₅₀ derivados de los datos que se muestran en las Figuras 5A-E. El valor de EC₅₀ se calculó usando la herramienta adicional Xlfit en Excel graficando los datos en bruto de las señales contra los TCB titulados.

Tabla 1. EC₅₀ de inactivación mediada por TCB anti-GPRC5D

	NCI-H929	RPMI-8226	L363	AMO-1	WSI-DLCL2
5E11-TCB	0,007 nM	0,024 nM	0,012 nM	0,014 nM	/
5F11-TCB	0,001 nM	0,002 nM	0,001 nM	0,003 nM	/
ET150-5-TCB	0,833 nM	0,797 nM	0,768 nM	0,0835 nM	/

Ejemplo 5

Activación de linfocitos T mediada por TCB anti-GPRC5D

Para abordar mecánicamente los modos de acción de los TCB anti-GPRC5D, se midió la activación de los linfocitos T después del cocultivo con líneas celulares de mieloma múltiple diana en presencia de TCB anti-GPRC5D. De manera similar al experimento descrito en el Ejemplo 4 y las Figuras 5A-E, las líneas celulares se cocultivaron a una relación diana:efector de 1:10 con 3,105 linfocitos T alógenos aislados de PBMC (capa leucocítica de Blutspende Schlieren) con un kit de aislamiento de linfocitos T Pan humanos (Miltenyi Biotec) en medio IMDM (Gibco) complementado con 10 % de FBS (Gibco) + 1 % de PS (Gibco). Se agregaron anticuerpos TCB anti-GPRC5D humano (5E11-TCB, 5F11-TCB, ET150-5-TCB o DP47-TCB) al cocultivo a una concentración diferente, en el rango de 1 µg/ml a 0,000001 µg/ml con dilución en serie de factor 0,1 o 0 µg/ml. Después de 20 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, se tiñeron las células para evaluar la activación de linfocitos T. Las células se tiñeron primero con tinte azul vivo (Life Technologies) diluido 1:800 en PBS (Gibco) durante 20 min a 4 °C. Después, las células se tiñeron con AF700 anti-CD4 humano (clon OKT4), BV711 anti-CD8 humano (clon SK1), BV605 anti-CD25 humano (clon BC96), APC-Cy7 anti-CD69 humano (clon FN50), en todos los casos de BioLegend y PE-Cy5.5 anti-CD3 humano (clon SK7; eBioscience) en amortiguador de tinción de citometría de flujo (eBioscience) durante 30 min a 4 °C. Se realizó una adquisición de citometría de flujo en un BD Biosciences Fortessa diseñado de manera personalizada y se la analizó con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) y el software GraphPad Prism.

La Figura 6 muestra que 5F11-TCB induce la activación de linfocitos T en cocultivos con células NCI-H929 mediante la regulación ascendente de los marcadores de activación CD25 y CD69, mientras que los controles, por ejemplo, DP47-TCB no dirigido y sin ningún TCB, no indujeron la activación de linfocitos T. Como otro control negativo, los linfocitos T tratados con 5F11-TCB se cocultivaron con células WSU-DLCL2, en donde los linfocitos T tampoco se activaron. Estos perfiles de activación fueron consistentes en las múltiples líneas celulares estudiadas, por ejemplo, AMO-1, NCI-H929, RPMI-8226, L363 (Figuras 7A-J). En consonancia con la deficiente potencia de inactivación, ET150-5-TCB no indujo la activación de linfocitos T excepto a la máxima concentración evaluada de 1 mg/kg.

Ejemplo 6

Localización e internalización de TCB anti-GPRC5D

Las células NCI-H929 se tiñeron con CMFDA (Invitrogen) y se sembraron en cubreobjetos redondos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma) en placas de 24 cavidades. Los anticuerpos (5E11-IgG, 5E11-TCB, 5F11-IgG, 5F11-TCB) se etiquetaron con un éster de succinimidilo Alexa Fluor 647 (Invitrogen, N.º de cat. A201106) a una relación molar de 2,5. Se dejó que las células se adhieran durante la noche a 37 °C antes de agregar directamente anticuerpos etiquetados de manera fluorescente (5E11-IgG, -5E11-TCB, -5F11-IgG, -5F11-TCB etiquetados con Alexa Fluor 647) en medio de cultivo durante diferentes períodos y a diferentes temperaturas (30 min en hielo, 1 hora a 37 °C y 3 horas a 37 °C). Se usó PBS (Lonza) fría para inactivar la reacción y para quitar mediante lavado los anticuerpos no fijados después de cada punto temporal. Las células se fijaron luego con Cytfix (BD) durante 20 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS. Los cubreobjetos luego se transfirieron y colocaron en portaobjetos de vidrio con Fluoromount G (eBioscience) y se mantuvieron a oscuras a 4 °C durante la noche antes de tomar las imágenes. Se realizó microscopía confocal de fluorescencia con un LSM 700 invertido de Zeiss con un objetivo de aceite 60x. Se recolectaron imágenes con el software Zen (Zeiss) acoplado al microscopio y se las visualizó en el software IMARIS (Bitplane). La Figura 8A muestra que todos los anticuerpos tiñeron la superficie (membrana plasmática) de la línea celular de mieloma múltiple a 4 °C o 37 °C. Si las células internalizan los anticuerpos, entonces aparecerá la tinción fluorescente en el citoplasma cuando se cultiva a 37 °C. No se observó internalización alguna de las IgG de fijación a GPRC5D o los TCB de fijación a GPRC5D por parte de las líneas celulares GPRC5D⁺. Esto se confirmó adicionalmente al aplicar la suma de intensidad de las regiones de interés definidas por la membrana y el citoplasma de las células (a las tres horas). Se utilizó el software IMARIS para el análisis y la cuantificación de la relación de señal de membrana con respecto a citoplasma. La Figura 8B indica que, 3 horas después de la incubación con los diferentes anticuerpos, la relación de intensidad de membrana con respecto a intensidad citoplasmática no cambió a ~4, lo que significa que las señales fluorescentes se concentran en la superficie, no en el citoplasma.

Ejemplo 7

Caracterización de los aglutinantes de GPRC5D: fijación a células recombinantes mediante ELISA

Se utilizaron clones de CHO transfectados estables que expresaban ya sea GPRC5D humano o GPRC5D de *Macaca fascicularis* o GPRC5D murino o GPRC5A humano para analizar la fijación de potenciales anticuerpos candidatos iniciales como IgG. En detalle, 10^4 células (viabilidad $\geq 98\%$) se sembraron en placas de microtitulación de 384 cavidades (poli D-lisina BD, N.º 356662, volumen: 25 μl /cavidad) usando medio de cultivo fresco. Después de incubación durante la noche a 37°C , se agregaron 25 μl /cavidad de diluciones de anticuerpos (15 x diluciones 1:3 en 1xPBS, la concentración del ensayo comienza en 30 $\mu\text{g/ml}$) a las células durante 2 horas a 4°C . Después de una etapa de lavado con 90 μl /cavidad de PBST (10x PBS, Roche, N.º 11666789001 + 0,1 % de Tween 20), las células se fijaron posteriormente mediante la adición de 50 μl /cavidad de 0,05 % glutaraldehído (Sigma, N.º de cat.: G5882 en 1xPBS) durante 10 min a temperatura ambiente (RT). Después de tres etapas adicionales de lavado con 90 μl /cavidad de PBST, se agregaron anticuerpos secundarios para la detección: para anticuerpos humanos, se utilizó conjugado de HRP y anticuerpo de cadena κ anti-Ig humana de cabra (Millipore, N.º AP502P) diluido a razón de 1:2000 en amortiguador de bloqueo (1x PBS (Roche, N.º 11666789001) + 2 % de BSA (fracción V de albúmina de suero bovino, libre de ácidos grasos, Roche, N.º 10735086001) + 0,05 % de Tween 20) (25 μl /cavidad). Para anticuerpos de rata, se utilizó una mezcla de conjugado de HRP y anticuerpo anti-IgG1 de rata en cabra (Bethyl, N.º A110-106P), conjugado de HRP y anticuerpo anti-IgG2a de rata en cabra (Bethyl, N.º A110-109P) y conjugado de HRP y anticuerpo anti-IgG2b de rata en cabra (Bethyl, N.º A110-111P) en una dilución 1:10000 de cada anticuerpo en amortiguador de bloqueo (25 μl /cavidad). Después de una incubación durante 1 h a RT y tres etapas adicionales de lavado con 90 μl /cavidad de PBST, se agregaron 25 μl /cavidad de sustrato de TMB (Roche, número de pedido 11835033001) durante 10 min y se determinó el desarrollo de color hasta OD finales mediante la medición a 370 nm/492 nm.

Todos los anticuerpos evaluados mostraron una fijación positiva a GPRC5D humano con valores de EC_{50} (que reflejan avidéz) en el rango de pM. Solo las IgG de rata 10B10 y 07A04 mostraron reactividad cruzada en células CHO que expresaban el GPRC5D de *Macaca fascicularis* con valores de EC_{50} comparables con la versión humana del receptor (Figura 9). También se detectó reactividad cruzada de *Macaca fascicularis* con todos los

otros anticuerpos pero a niveles menores en comparación con 10B10 y 07A04 (Figura 9). No se detectó fijación significativa a células CHO que expresaban GPRC5D murino y no se detectó fijación alguna a células CHO que expresaban la versión humana de GPRC5A (Figura 9). Los valores de EC₅₀ de la fijación se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de fijación a GPRC5D en distintas especies basado en ELISA

Anticuerpo IgG	GPRC5D+ CHO humanas		GPRC5D+ CHO de Macaca fascicularis	
	EC50 (ng/ml)	EC50 (nM)	EC50 (ng/ml)	EC50 (nM)
5E11	29,57	0,198	-	-
5F11	21,67	0,144	-	-
10B10	16,34	0,109	12	0,080
07A04	24,26	0,162	114,54	0,764

Ejemplo 8

Aglutinantes de GPRC5D: GPRC5D-TCB recombinante media la citotoxicidad de linfocitos T en líneas celulares de MM

Para comparar la funcionalidad de GPRC5D-TCB u otros TCB dirigidos, se realizó un ensayo de citotoxicidad de linfocitos T in vitro en múltiples líneas celulares de MM: MOLP-2 (Figura 10B), AMO-1 (Figura 10C), EJM (Figura 10D) y NCI-H929 (Figura 10G). Sucintamente, las líneas celulares se cultivaron en RPMI 1640 + medio Glutamax (Gibco) complementado con 20 % de suero bovino fetal (FBS; Gibco) inactivado por calor y 1 % de penicilina - estreptomina 100X (PS; Gibco). MOLP-2 se cultivó con este medio complementado con GlutaMax 1X (Gibco). Las líneas celulares OPM-2 (Figura 10A), RPMI-8226 (Figura 10E) y L-363 (Figura 10F) se cultivaron con este medio complementado con solo 10 % de FBS. NCI-H929 se cultivó con este medio complementado con mercaptoetanol 50 μ M (Gibco), piruvato de sodio 1mM (Gibco) y GlutaMax 1X (Gibco). EJM se cultivó en IMDM (Gibco) + 10 % de FBS (Gibco) y 1 % de PS (Gibco). Todas las líneas celulares se cultivaron en un matraz de 75 cm² (TPP) con dos pasadas por semana.

Las líneas celulares se cocultivaron a una relación de efector con respecto a diana de 10 a 1, con 0,3 millones de linfocitos T alógenos aislados de PBMC (capa leucocítica de Blutspende Schlieren) con un kit de aislamiento de linfocitos T Pan humanos (Miltentyi Biotec) en medio RPMI (Gibco) complementado con 10 % de FBS (Gibco) + 1 % de PS (Gibco). Se agregó constructo de TCB anti-GPRC5D humano (5E11-TCB, 5F11-TCB, 10B10-TCB, B72-TCB, BCMA-TCB y DP47-TCB) al cocultivo a concentraciones diferentes, de 12,5 nM a 0,0000125 nM con dilución en serie de 1/10 y en comparación con muestras no tratadas. Después de 20 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, 75 µl de sobrenadante por cavidad se transfirieron a una placa blanca de 96 cavidades (Greiner bio-one) con 25 µl por cavidad de ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo (Promega). Se realizó una adquisición de luminiscencia en el PerkinElmer EnVision después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y se la analizó con los softwares GraphPad Prism y XL fit. Los datos se graficaron como la señal de luminiscencia para la liberación de LDH (Figura 10). Las Figuras 10A-G resumen los datos que muestran que tanto 5E11-TCB como 5F11-TCB mediaron una citotoxicidad de linfocitos T más fuerte en las líneas celulares de MM en comparación con BCMA-TCB, 10B10-TCB y B72-TCB. La EC₅₀ de la inactivación mediada por TCB se muestra en la Tabla 3, y se la calcula como el promedio de diferentes experimentos con diferentes linfocitos T donantes (n=2 o n=3).

Tabla 3. Valores de EC₅₀ en ensayo de inactivación *in vitro*

EC ₅₀ (pM)	n=3				n=2		
Líneas celulares	NCI-H929 (Figura 10G)	AMO-1 (Figura 10C)	MOLP-2 (Figura 10B)	L363 (Figura 10F)	EJM (Figura 10D)	OPM-2 (Figura 10A)	RPMI (Figura 10E)
5F11-TCB	4	6	1	3	3	1	6
5E11-TCB	7	8	18	17	11	2	64
10B10-TCB	56	84	160	34	79	28	965
B72-TCB	58	109	124	58	60	171	193
BCMA-TCB	311	518	32	127	132	33	11

Ejemplo 9

Activación de linfocitos T *in vitro* en células sanas de médula ósea humana

Se procesó médula ósea no procesada fresca de cuatro donantes sanos diferentes (Lonza N.° 1M-105, lote 0000739254; 0000739255; 0000739256 y 0000734008) 1 o 2 días después del muestreo. Después de una rápida lisis de glóbulos rojos con amortiguador de lisis BD Pharm (BD N.° 555899; 1X en agua estéril) durante 5 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron 2 veces mediante centrifugación e intercambio de amortiguador a 126 g y 443 g, respectivamente. Las células se contaron y se volvieron a suspender a razón de 300.000 células/ml en RPMI 1640 Glutamax + 20 % de suero bovino fetal HI + 2 % de suero humano + 1 % de penicilina/estreptomicina (de Gibco en todos los casos) y se colocaron 100 µl de suspensión celular en cada cavidad de una placa de 96 cavidades con fondo redondo (TPP). Se agregaron por cavidad 50 µl de medio o medio complementado con B72-TCB, 5F11-TCB, 5E11-TCB, BCMA-TCB, 10B10-TCB o DP47-TCB de 200 nM (4X) a 20 pM con dilución en serie de 1/10. Finalmente, se agregaron 50 µl de linfocitos T alógenos aislados con linfocito Pan T (Miltenyi Biotec, N.° 130-096-535) de PBMC de donantes sanos a 6 millones/ml (relación de linfocitos T efectores con respecto a células diana sanas de médula ósea de 10:1). Después de incubación durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada, las células se lavaron con PBS una vez y se tiñeron durante 20 minutos a 4 °C con 50 µl de azul vivo (Invitrogen, N.° L23105) diluido a 1/800 en PBS. Después de un lavado, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con la siguiente mezcla de anticuerpos diluida en amortiguador FACS (PBS 1X, 2 % de suero bovino fetal; 1 % de EDTA 0,5m pH 8; 0,25 % de NaN₃ azida de sodio (20 %)): CD25 BV605, CD69 APC-Cy7, BCMA BV421, CD38 BV510, CD138 FITC, FcRH5 PE diluidos a 1/100 y CD8 BV711, CD3 PE-Cy5 y CD4 AlexaFluor 700 diluidos a 1/300 (en todos los casos de BioLegend) y GPRC5D AlexaFluor 647 (elaboración interna, clon 5E11 IgG). Después de un lavado, las células se volvieron a suspender en 100 µl de amortiguador FACS y se adquirieron con un Fortessa (BD Biosciences).

Los datos presentados en las Figuras 11A-F ilustran que B72-TCB indujo la activación no específica de linfocitos T (según lo medido mediante la regulación ascendente de CD69) en la médula ósea sana, algo que no ocurrió con los otros TCB evaluados. Como se indicó, la activación no específica inducida por B72-TCB fue un efecto dependiente de la concentración y fue más pronunciada a 50 nm que a 5 nm (Figuras 12A y 12B).

Ejemplo 10

Eficacia *in vivo* de TCB

En el estudio de eficacia se compararon diferentes constructos de TCB (GPRC5D 5F110-TCB, 5E11-TCB, BCMA-TCB y B72-TCB) en lo que respecta a la regresión tumoral en ratones NSG completamente humanizados que tenían mieloma múltiple. Se obtuvieron originalmente células NCI-H929 de ATCC y células OPM-2 de DSMZ. Ambas líneas celulares se expandieron. Las células se cultivaron en RPMI que contenía 10 % de FCS y L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a 5 % de CO₂. Se inyectaron por vía subcutánea 2,5 x10⁶ células NCI-H929 y 5 x10⁶ células OPM-2 por animal en el flanco derecho de los animales en medio de cultivo celular RPMI (Gibco) y GFR matrigel (1:1, volumen total de 100 µl) a una viabilidad de >95,0 %.

Los ratones NSG hembra (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ), de 4-5 semanas de vida al comienzo del experimento (criados en Charles River, Lyon, Francia), se mantuvieron en una condición libre de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con pautas estrictas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El gobierno local revisó y aprobó el protocolo de estudio experimental (ROB-55.2-2532.Vet_03-16-10). Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbren al nuevo entorno y para observarlos. Se llevó a cabo de manera regular un monitoreo continuo de la salud.

De acuerdo con el protocolo, los ratones NSG hembra recibieron una inyección por vía i.p. (intraperitoneal) de 15 mg/kg de Busulfán, seguida un día después por una inyección por vía i.v. de 1x10⁵ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 16-20 después de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones y esta se analizó mediante citometría de flujo para determinar si la humanización tuvo éxito. Los ratones injertados de manera eficaz se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento (n=10/grupo). En ese momento, los ratones recibieron una inyección por vía subcutánea de células tumorales como se describió anteriormente y se trataron una vez por semana con los compuestos o PBS (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 200 mm³. Todos los ratones recibieron por vía intravenosa inyecciones de diferentes dosis de moléculas de TCB (ver las Figuras 13A-D y 14A-D).

Para obtener la cantidad adecuada de los compuestos, se diluyeron soluciones de

reserva con amortiguador de histidina (histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0). El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana con un calibre y el volumen tumoral se calculó de la siguiente manera:

$$T_v: (W^2/2) \times L \quad (W: \text{ancho}, L: \text{longitud})$$

El estudio se terminó, todos los ratones se sometieron a eutanasia después de cuatro inyecciones de los compuestos y se extirparon y pesaron los tumores.

Las Figuras 13A-D muestran la cinética del crecimiento tumoral en todos los animales, que habían recibido inyecciones de NCI-H929, después del tratamiento. 5F11-TCB indujo una remisión tumoral completa en todos los animales ya sea a 1 mg/kg o 0,1 mg/kg (Figura 13A), mientras que B72-TCB solo indujo una remisión tumoral parcial cuando se usó a 1 mg/kg y no tuvo efecto a 0,1 mg/kg (Figura 13C). BCMA-TCB también indujo una remisión tumoral parcial a 1 mg/kg (Figura 13B).

Las Figuras 14A-D muestran la cinética del crecimiento tumoral en todos los animales, que habían recibido inyecciones de OPM-2, después del tratamiento. 5F11-TCB (Figura 14A, panel superior) y 5E11-TCB (Figura 14B, panel superior) indujeron una remisión tumoral completa en la mayoría de los animales a 0,1 mg/kg, mientras que B72-TCB (Figura 14C, panel superior) a 0,1 mg/kg fue menos potente en lo que respecta a controlar el crecimiento tumoral. A 0,01 mg/kg, 5F11-TCB (Figura 14A, panel inferior) y 5E11-TCB (Figura 14B, panel inferior) fueron más potentes en lo que respecta a inhibir el crecimiento tumoral en comparación con B72-TCB (Figura 14C, panel inferior).

Ejemplo 11

Humanización de anticuerpos anti-GPRC5D

Se identificaron marcos aceptores humanos adecuados al consultar una base de datos BLASTp de secuencias de las regiones V y J humanas en búsqueda de las secuencias murinas de entrada (recortadas a la parte variable). Los criterios selectivos para la elección del marco aceptor humano fueron homología de secuencia, longitudes de CDR iguales o similares y la frecuencia estimada de la línea germinal humana, aunque también la conservación de ciertos aminoácidos en la interfaz de dominio VH-VL. Tras la etapa de identificación de la línea germinal, las CDR de las secuencias murinas de entrada se injertaron en las regiones de marco aceptoras humanas. Se calificó cada diferencia de aminoácido entre estos injertos de CDR iniciales y los anticuerpos parentales en virtud de su posible impacto en la integridad estructural de la región variable respectiva, y se

introdujeron "retromutaciones" hacia la secuencia parental siempre que se lo consideró adecuado. La evaluación estructural se basó en modelos de homología de la región Fv de tanto el anticuerpo parental como las variantes de humanización, creados con un protocolo interno de modelado de homología de las estructuras de anticuerpos implementado con el BIOVIA Discovery Studio Environment, versión 17R2. En algunas variantes de humanización, se incluyeron "mutaciones anterógradas", es decir, intercambios de aminoácidos que cambian el aminoácido original que se produce en una posición de CDR determinada del aglutinante parental por el aminoácido encontrado en la posición equivalente de la línea germinal aceptora humana. El objetivo es aumentar el carácter humano general de las variantes de humanización (más allá de las regiones de marco) para reducir aún más el riesgo de inmunogenicidad.

Se utilizó una herramienta *in silico* desarrollada de manera interna para predecir la orientación del dominio VH-VL de las variantes de humanización VH y VL apareadas (como WO 2016/062734A1, que se incorpora por referencia en su totalidad). Los resultados se compararon con la orientación del dominio VH-VL prevista de los aglutinantes parentales para seleccionar las combinaciones de marco con geometrías cercanas a las de los anticuerpos originales. La idea es detectar posibles intercambios de aminoácidos en la región de interfaz VH-VL que podrían llevar a cambios alteradores en el apareamiento de los dos dominios, los cuales podrían a su vez tener efectos perjudiciales sobre las propiedades de fijación.

Elección de marco aceptor y adaptaciones de este para el aglutinante de GPRC5D 5E11

Los marcos aceptores se eligieron de acuerdo con la siguiente Tabla 4.

Tabla 4. Marcos aceptores para el aglutinante de GPRC5D 5E11

	Línea germinal de la región V murina (<i>Rattus norvegicus</i>)	Elección de la línea germinal de la región V aceptora humana
VH1abcd	IGHV5S13*01	IGHV3-23*03
VL1ac	IGKV3S18*01	IGKV4-1*01_human
VL2ab		IGKV3-20*01_human
VL3ab		IGKV1-39*01_human

Las regiones de marco posteriores a CDR3 se adaptaron a partir de la línea germinal de IGHJ humana IGHJ3*02 (DAFDI**WGQGTMVTVSS**) y la línea germinal de IGKJ humana IGKJ5*01 (IT**FGQGTRLEIK**). La parte relevante para el marco aceptor se indica en negrita.

En función de consideraciones estructurales, se introdujeron retromutaciones del marco aceptor humano al aminoácido en el aglutinante parental en ciertas posiciones de las variantes de humanización de 5E11 (Tablas 5 y 6). Además, algunas posiciones se identificaron como candidatos prometedores para mutaciones anterógradas, donde el aminoácido en una CDR del aglutinante parental se sustituye con el aminoácido encontrado en la línea germinal aceptora humana. Los cambios se detallan en la tabla a continuación.

Nota: Las retromutaciones tienen **b** de prefijo, las mutaciones anterógradas tienen **f** de prefijo, por ejemplo, bS49A se refiere a una retromutación (aminoácido de la línea germinal humana a aminoácido de anticuerpo parental) de serina a alanina en la posición 49. Todos los índices de residuos se proporcionan de acuerdo con la numeración Kabat.

Tabla 5. Lista de variantes de humanización de VH/VL 5E11

Nombre de la variante	Identidad con la línea germinal de la región V humana (BLASTp)
5E11_VH1a (bS49A_bK94T)	89,7
5E11_VH1b (bV2L_bS49A_bS74A_bK94T)	87,6
5E11_VH1c (bS49A_fR60A_fA65G_bK94T)	91,8
5E11_VH1d (bV2L_bS49A_fR60A_fA65G_bS74A_bK94T)	89,7
5E11_VL1a (bP43Q)	80,2
5E11_VL1c (fR24K_fA25S_bP43Q)	82,2
5E11_VL2a (bA43Q)	86,2
5E11_VL2b (bA43Q_bR45K)	85,1
5E11_VL3a (bA43Q)	83,8
5E11_VL3b (bK42Q_bA43Q)	82,8

Tabla 6. Secuencias de variantes de humanización de VH/VL 5E11

nombre	secuencia de aa	SEQ ID NO.
5E11_V H1a	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTV SS	46
5E11_V H1b	ELQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTV SS	47
5E11_V H1c	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTV SS	48
5E11_V H1d	ELQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTV SS	49
5E11_VL 1a	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSISGINLMNWy QQKPGQQPKLLIYHASILASGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	50
5E11_VL 1c	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSISGINLMNWy QQKPGQQPKLLIYHASILASGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	51
5E11_VL 2a	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWy QQKPGQQPRLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	52
5E11_VL 2b	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWy QQKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	53
5E11_VL 3a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVSISGINLMNWy QQKPGKQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	54
5E11_VL 3b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVSISGINLMNWy QQKPGQQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK	55

Elección de marco aceptor y adaptaciones de este para el aglutinante de GPRC5D 5F11

Los marcos aceptores se eligieron de acuerdo con la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Marcos aceptores para el aglutinante de GPRC5D 5F11

	Línea germinal de la región V murina (<i>Rattus norvegicus</i>)	Elección de la línea germinal de la región V aceptor humana
VH1abcd	IGHV5S13*01	IGHV3-30*03
VH2bd		IGHV3-23*04
VL1ab, VL2a	IGKV2S17*01	IGKV2-28*01
VL2b		IGKV4-1*01
VL2c		IGKV3-20*01

Las regiones de marco posteriores a CDR3 se adaptaron a partir de la línea germinal de IGHJ humana IGHJ3*02 (DAFDI**WGQGTMTVSS**) y la línea germinal de IGKJ humana IGKJ2*01 (YT**FGQGTKLEIK**). La parte relevante para el marco aceptor se indica en negrita.

En función de consideraciones estructurales, se introdujeron retromutaciones del marco aceptor humano al aminoácido en el aglutinante parental en ciertas posiciones de las variantes de humanización de 5F11 (Tablas 8 y 9). Además, algunas posiciones se identificaron como candidatos prometedores para mutaciones anterógradas, donde el aminoácido en una CDR de aglutinante parental se sustituye con el aminoácido encontrado en la línea germinal aceptor humana. Los cambios se detallan en la tabla a continuación.

Nota: Las retromutaciones tienen **b** de prefijo, las mutaciones anterógradas tienen **f** de prefijo, por ejemplo, bA93T se refiere a una retromutación (aminoácido de la línea germinal humana a aminoácido de anticuerpo parental) de alanina a treonina en la posición 93. Todos los índices de residuos se proporcionan de acuerdo con la numeración Kabat.

Tabla 8. Lista de variantes de humanización de VH/VL 5F11

Nombre de la variante	Identidad con la línea germinal de la región V humana (BLASTp)
5F11_VH1a (bA93T)	89,8
5F11_VH1b (bQ1E_bS74A_bA93T)	87,8
5F11_VH1c (fR60A_bA93T)	90,8
5F11_VH1d (bQ1E_fR60A_bS74A_bA93T)	88,8
5F11_VH2b (bS49A_bS74A_bA93T_bK94R)	86,7
5F11_VH2d (bS49A_fR60A_bS74A_bA93T_bK94R)	87,8
5F11_VL1a (bL46V_bY87H)	86,0
5F11_VL1b (bQ42K_bL46V_bY87H)	85,0
5F11_VL2a (bY87H)	88,0
5F11_VL2b (bY87H)	80,2
5F11_VL2c (fS25A_bY87H)	80,0

Tabla 9. Secuencias de variantes de humanización de VH/VL 5F11

variante	secuencia de aa	SEQ ID NO.
5F11_V H1a	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHRDGGGLYWGQGTMTVS S	56
5F11_V H1b	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHRDGGGLYWGQGTMTVS S	57
5F11_V H1c	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHRDGGGLYWGQGTMTVS S	58

5F11_V H1d	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVTS S	59
5F11_V H2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVTS S	60
5F11_V H2d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMTVTS S	61
5F11_VL 1a	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYVYWY LQKPGQSPQVLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	62
5F11_VL 1b	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYVYWY LQKPGKSPQVLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	63
5F11_VL 2a	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYVYWY LQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	64
5F11_VL 2b	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSLHNSNGITYVYWY YQQKPGQPPKLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIS SSLQAEDVAVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	65
5F11_VL 2c	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASKSLHNSNGITYVYWY QQKPGQAPRLLIYRMSNLAGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK	66

Caracterización de variantes de humanización mediante ELISA

Para la caracterización de las variantes de humanización de los dominios VH y VL de los aglutinantes de GPRC5D, se utilizó el protocolo de ELISA descrito con anterioridad (ver el Ejemplo 7). Los datos se resumen en la Tabla 10 al respecto de las variantes de humanización de 5E11 y en la Tabla 11 al respecto de las variantes de humanización de 5F11. La Tabla 12 muestra secuencias de CDR del 5E11 parental y 5E11 parental y de variantes de humanización seleccionadas.

Tabla 10. Caracterización de variantes de humanización de 5E11

		Humanidad					CHO hu GPCR5D		CHO cy GPCR 5D
Tapir	Clase	VH	VL	VH huID	VL huID	Fv huID	EC/IC50 rel (ng/ml)	EC/IC50 rel (nM)	EC/IC50 rel (ng/ml)
P1AE5 706	1	parental	parental				10,4	0,07	na
P1AE5 707	2	VH1a	VL1a	89,7	80,2	84,95	14,2	0,09	na
P1AE5 708	3	VH1a	VL1c	89,7	82,2	85,95	12,0	0,08	na
P1AE5 709	4	VH1a	VL2a	89,7	86,2	87,95	19,1	0,13	na
P1AE5 710	5	VH1a	VL2b	89,7	85,1	87,4	10,1	0,07	na
P1AE5 712	6	VH1a	VL3a	89,7	83,8	86,75	13,1	0,09	na
P1AE5 713	7	VH1a	VL3b	89,7	82,8	86,25	16,5	0,11	na
P1AE5 714	8	VH1b	VL1a	87,6	80,2	83,9	12,9	0,09	na
P1AE5 715	9	VH1b	VL1c	87,6	82,2	84,9	21,1	0,14	na
P1AE5 716	10	VH1b	VL2a	87,6	86,2	86,9	15,1	0,10	na
P1AE5 717	11	VH1b	VL2b	87,6	85,1	86,35	13,9	0,09	na
P1AE5 718	12	VH1b	VL3a	87,6	83,8	85,7	12,1	0,08	na
P1AE5 719	13	VH1b	VL3b	87,6	82,8	85,2	16,6	0,11	na
P1AE5 720	14	VH1c	VL1a	91,8	80,2	86	21,7	0,14	na

P1AE5 721	15	VH1c	VL1c	91,8	82,2	87	18,3	0,12	na
P1AE5 722	16	VH1c	VL2a	91,8	86,2	89	19,7	0,13	na
P1AE5 723	17	VH1c	VL2b	91,8	85,1	88,45	6,0	0,04	na
P1AE5 724	18	VH1c	VL3a	91,8	83,8	87,8	5,3	0,04	na
P1AE5 725	19	VH1c	VL3b	91,8	82,8	87,3	5,1	0,03	na
P1AE5 726	20	VH1d	VL1a	89,7	80,2	84,95	7,6	0,05	na
P1AE5 727	21	VH1d	VL1c	89,7	82,2	85,95	8,7	0,06	na
P1AE5 728	22	VH1d	VL2a	89,7	86,2	87,95	7,9	0,05	na
P1AE5 729	23	VH1d	VL2b	89,7	85,1	87,4	10,4	0,07	na
P1AE5 730	24	VH1d	VL3a	89,7	83,8	86,75	8,0	0,05	na
P1AE5 731	25	VH1d	VL3b	89,7	82,8	86,25	5,2	0,03	na

Tabla 10. Continuación

		Humanidad					CHO hu GPCR5A	CAR-J2 EC50
Tapir	Clas e	VH	VL	VH huID	VL huID	Fv huID	EC/IC50 rel (ng/ml)	[ng/ml]
P1AE570 6	1	parental	parental				na	3,9
P1AE570 7	2	VH1a	VL1a	89,7	80,2	84,95	na	42,4
P1AE570 8	3	VH1a	VL1c	89,7	82,2	85,95	na	455,8

P1AE570 9	4	VH1a	VL2a	89,7	86,2	87,95	na	59,4
P1AE571 0	5	VH1a	VL2b	89,7	85,1	87,4	na	3,5
P1AE571 2	6	VH1a	VL3a	89,7	83,8	86,75	na	16,1
P1AE571 3	7	VH1a	VL3b	89,7	82,8	86,25	na	76,9
P1AE571 4	8	VH1b	VL1a	87,6	80,2	83,9	na	5,5
P1AE571 5	9	VH1b	VL1c	87,6	82,2	84,9	na	3,6
P1AE571 6	10	VH1b	VL2a	87,6	86,2	86,9	na	3,3
P1AE571 7	11	VH1b	VL2b	87,6	85,1	86,35	na	79,9
P1AE571 8	12	VH1b	VL3a	87,6	83,8	85,7	na	105,4
P1AE571 9	13	VH1b	VL3b	87,6	82,8	85,2	na	2,8
P1AE572 0	14	VH1c	VL1a	91,8	80,2	86	na	6,3
P1AE572 1	15	VH1c	VL1c	91,8	82,2	87	na	25
P1AE572 2	16	VH1c	VL2a	91,8	86,2	89	na	4,6
P1AE572 3	17	VH1c	VL2b	91,8	85,1	88,45	na	3,7
P1AE572 4	18	VH1c	VL3a	91,8	83,8	87,8	na	3,6
P1AE572 5	19	VH1c	VL3b	91,8	82,8	87,3	na	10,9
P1AE572 6	20	VH1d	VL1a	89,7	80,2	84,95	na	37,8
P1AE572 7	21	VH1d	VL1c	89,7	82,2	85,95	na	6,3

P1AE572 8	22	VH1d	VL2a	89,7	86,2	87,95	na	5,6
P1AE572 9	23	VH1d	VL2b	89,7	85,1	87,4	na	61,3
P1AE573 0	24	VH1d	VL3a	89,7	83,8	86,75	na	3,5
P1AE573 1	25	VH1d	VL3b	89,7	82,8	86,25	na	2,3

Tabla 11. Caracterización de variantes de humanización de 5F11

		Humanidad					CHO hu GPCR5D	
	Clase	VH	VL	VH huID	VL huID	Fv huID	EC/IC50 rel (ng/ml)	EC/IC50 rel (nM)
P1AE5733	1	parental	parental				5,8	0,04
P1AE5734	2	VH1a	VL1a	89,8	86	87,9	5,5	0,04
P1AE5735	3	VH1a	VL1b	89,8	85	87,4	6,6	0,04
P1AE5736	4	VH1a	VL2a	89,8	88	88,9	3,7	0,02
P1AE5737	5	VH1a	VL2b	89,8	80,2	85	5,9	0,04
P1AE5738	6	VH1a	VL2c	89,8	80	84,9	4,1	0,03
P1AE5739	7	VH1b	VL1a	90,8	86	88,4	4,0	0,03
P1AE5740	8	VH1b	VL1b	90,8	85	87,9	6,3	0,04
P1AE5741	9	VH1b	VL2a	90,8	88	89,4	6,7	0,04
P1AE5742	10	VH1b	VL2b	90,8	80,2	85,5	6,1	0,04
P1AE5743	11	VH1b	VL2c	90,8	80	85,4	7,6	0,05
P1AE5744	12	VH1c	VL1a	90,8	86	88,4	8,6	0,06
P1AE5745	13	VH1c	VL1b	90,8	85	87,9	9,7	0,06
P1AE5746	14	VH1c	VL2a	90,8	88	89,4	10,7	0,07
P1AE5747	15	VH1c	VL2b	90,8	80,2	85,5	9,0	0,06
P1AE5749	16	VH1c	VL2c	90,8	80	85,4	7,4	0,05
P1AE5750	17	VH1d	VL1a	89,8	86	87,9	9,4	0,06
P1AE5751	18	VH1d	VL1b	89,8	85	87,4	12,4	0,08
P1AE5752	19	VH1d	VL2a	89,8	88	88,9	6,2	0,04
P1AE5753	20	VH1d	VL2b	89,8	80,2	85	10,4	0,07
P1AE5754	21	VH1d	VL2c	89,8	80	84,9	9,0	0,06
P1AE5755	22	VH2b	VL1a	90,8	86	88,4	7,8	0,05

P1AE5756	23	VH2b	VL1b	90,8	85	87,9	7,8	0,05
P1AE5757	24	VH2b	VL2a	90,8	88	89,4	2,9	0,02
P1AE5758	25	VH2b	VL2b	90,8	80,2	85,5	2,6	0,02
P1AE5759	26	VH2b	VL2c	90,8	80	85,4	3,1	0,02
P1AE5760	27	VH2d	VL1a	89,8	86	87,9	4,0	0,03
P1AE5761	28	VH2d	VL1b	89,8	85	87,4	3,7	0,02
P1AE5762	29	VH2d	VL2a	89,8	88	88,9	4,6	0,03
P1AE5763	30	VH2d	VL2b	89,8	80,2	85	6,0	0,04
P1AE5764	31	VH2d	VL2c	89,8	80	84,9	4,5	0,03

Tabla 11. Continuación.

		Humanidad					CHO cy GPCR5D	CHO hu GPCR5A	CAR-J2 EC50
	Clase	VH	VL	VH huID	VL huID	Fv huID	EC/IC50 rel (ng/ml)	EC/IC50 rel (ng/ml)	[ng/ml]
P1AE 5733	1	parental	parental				na	na	2,65
P1AE 5734	2	VH1a	VL1a	89,8	86	87,9	na	na	41,53
P1AE 5735	3	VH1a	VL1b	89,8	85	87,4	na	na	82,08
P1AE 5736	4	VH1a	VL2a	89,8	88	88,9	na	na	1,38
P1AE 5737	5	VH1a	VL2b	89,8	80,2	85	na	na	2,95
P1AE 5738	6	VH1a	VL2c	89,8	80	84,9	na	na	397,43
P1AE 5739	7	VH1b	VL1a	90,8	86	88,4	na	na	23,54

P1AE 5740	8	VH1b	VL1b	90,8	85	87,9	na	na	8,96
P1AE 5741	9	VH1b	VL2a	90,8	88	89,4	na	na	1,4
P1AE 5742	10	VH1b	VL2b	90,8	80,2	85,5	na	na	61,93
P1AE 5743	11	VH1b	VL2c	90,8	80	85,4	na	na	583,32
P1AE 5744	12	VH1c	VL1a	90,8	86	88,4	na	na	3,63
P1AE 5745	13	VH1c	VL1b	90,8	85	87,9	na	na	1,62
P1AE 5746	14	VH1c	VL2a	90,8	88	89,4	na	na	514,19
P1AE 5747	15	VH1c	VL2b	90,8	80,2	85,5	na	na	182,79
P1AE 5749	16	VH1c	VL2c	90,8	80	85,4	na	na	82,59
P1AE 5750	17	VH1d	VL1a	89,8	86	87,9	na	na	20,58
P1AE 5751	18	VH1d	VL1b	89,8	85	87,4	na	na	6,44
P1AE 5752	19	VH1d	VL2a	89,8	88	88,9	na	na	508,96
P1AE 5753	20	VH1d	VL2b	89,8	80,2	85	na	na	30,03
P1AE 5754	21	VH1d	VL2c	89,8	80	84,9	na	na	8,89
P1AE 5755	22	VH2b	VL1a	90,8	86	88,4	na	na	151,74
P1AE 5756	23	VH2b	VL1b	90,8	85	87,9	na	na	170,2
P1AE 5757	24	VH2b	VL2a	90,8	88	89,4	na	na	144,74
P1AE 5758	25	VH2b	VL2b	90,8	80,2	85,5	na	na	189,51

P1AE 5759	26	VH2b	VL2c	90,8	80	85,4	na	na	15,7
P1AE 5760	27	VH2d	VL1a	89,8	86	87,9	na	na	189,94
P1AE 5761	28	VH2d	VL1b	89,8	85	87,4	na	na	74,56
P1AE 5762	29	VH2d	VL2a	89,8	88	88,9	na	na	84,16
P1AE 5763	30	VH2d	VL2b	89,8	80,2	85	na	na	5,47
P1AE 5764	31	VH2d	VL2c	89,8	80	84,9	na	na	78,22

Tabla 12. Secuencias de CDR de una selección de variantes de humanización

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR1	LCDR3
5E11 parental	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89
5E11_P1AE5723	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89
5E11_P1AE5728	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89
5F11 parental	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:97
5F11_P1AE5741	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:97
5F11_P1AE5745	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:97

Ejemplo 12

Activación *in vitro* de células CAR-J en presencia de diferentes variantes de humanización de IgG anti-GPRC5D seleccionadas

Se evaluó la capacidad de las diferentes IgG anti-GPRC5D humanizadas para activar las células efectoras PGLALA-CAR-J como se describe a continuación. Se cocultivaron

células diana de mieloma múltiple que expresan GPRC5D L363 (Diehl et al., Blut 36: 331-338 (1978)) con células efectoras anti-PGLALA-CAR-J (línea celular indicadora de leucemia linfática aguda humana Jurkat-NFAT que expresa un TCR dirigido contra la mutación PGLALA (P329G L234A L235A) en la parte Fc de las moléculas de IgG y que contiene un promotor NFAT, como se divulga en la solicitud PCT N.º PCT/EP2018/086038 y la solicitud PCT N.º PCT/EP2018/086067). Tras la fijación simultánea de la molécula de IgG a GPRC5D en las células L363 y las células PGLALA-CAR-J, el promotor NFAT se activa y produce la expresión de luciferasa de luciérnaga activa.

Para el ensayo, las variantes de IgG humanizadas se diluyeron en medio RPMI 1640 (que contenía Glutamax, 15 % de suero bovino fetal HI, 1 % de penicilina-estreptomicina; en todos los casos de GIBCO) y se transfirieron a placas de 96 cavidades de fondo redondo (rango de concentración final de 0,2 pg/ml a 10 µg/ml). Se agregaron 20.000 células L363 por cavidad y células efectoras anti-PGLALA-CAR-J para obtener una relación final de células efectoras (anti-PGLALA-CAR-J) con respecto a células diana (L363) de 5:1 y un volumen final de 200 µl por cavidad. Las células se incubaron durante aproximadamente 16 h a 37 °C en una incubadora humidificada. Al final del período de incubación, 100 µl/cavidad del sobrenadante se transfirieron a una placa blanca de 96 cavidades de fondo plano (Costar) y se incubaron con otros 100 µl/cavidad de sustrato de luciferasa ONE-Glo (Promega) durante 5 min antes de leer la luminiscencia con PerkinElmer Envision. Los datos se graficaron como señales de luminiscencia relativa (RLU) en función de la concentración de IgG con GraphPad Prism y la EC₅₀ se calculó con el software XL-fit.

Como se muestra en las Figuras 15A-B y la Tabla 13, todas las IgG de GPRC5D evaluadas indujeron la activación de CAR-J tras la fijación simultánea a células diana que expresan GPRC5D y células anti-PGLALA-CAR-J. Para los aglutinantes anti-GPRC5D 5F11 y 5E11, se podrían identificar variantes de humanización con valores de EC₅₀ similares o incluso mejores en comparación con los anticuerpos parentales antes de la humanización. Al respecto del aglutinante 5F11, la activación más fuerte podría ser inducida por la molécula P1AE5741 (Figura 15A). Al respecto del aglutinante 5E11, la activación más fuerte podría ser inducida por la molécula P1AE5730 y la P1AE5723 (Figura 15B).

Tabla 13. Valores de EC₅₀ de la activación de CAR-J

	Aglutinante 5F11					Aglutinante 5E11				
	P1AE573 3 (parental)	P1A E574 1	P1AE5 745	P1AE5 744	P1AE5 763	P1AE570 6 (parental)	P1AE 5723	P1AE5 728	P1AE5 730	P1AE5 718
EC ₅₀ (ng/ ml)	2,65	1,4	1,62	3,63	5,47	3,9	3,7	5,6	3,5	105,4

Ejemplo 13**Preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T adicionales**

Los principios de convertir aglutinantes en anticuerpos biespecíficos de linfocitos T se ejemplifican y describen en la técnica, por ejemplo, en la publicación PCT N.º WO 2014/131712 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T comprenden dos porciones de fijación a GPRC5D y una porción de fijación a CD3 (anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-GPRC5D/anti-CD3) como se muestra en la Figura 3. Se prepararon los siguientes anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-GPRC5D/anti-CD3: i) 6623 (SEQ ID NO: 114, 115, 116 y 117); ii) 6624 (SEQ ID NO: 118, 119, 120 y 121); iii) 6625 (SEQ ID NO: 122, 123, 124 y 125); iv) 6626 (SEQ ID NO: 126, 127, 128 y 129). DP47-TCB (el "TCB no dirigido") se describe en la publicación PCT N.º WO 2014/131712 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El B72 TCB deriva del anticuerpo contra GCDB72 divulgado en la Tabla 23 de WO 2018/0117786 A2 y comprende la porción de fijación a GPRC5D de GCDB72 (Ejemplo 7). El término "B72 TCB" también se refiere al término "B72" en la presente. El BCMA-TCB deriva de WO 2016/166629 A1 y comprende la porción de fijación a GPRC5D de A02_Rd4_6nM_C01 allí divulgada. BCMA-TCB se generó en el formato 2+1 crossmab (SEQ ID NO: 77, 78, 79, 80) como se describe para el Ejemplo 2. Los términos "5F11-TCB" y "5F11p-CH2527" se usan indistintamente en la presente. Los términos "5E11-TCB" y "5E11p-CH2527" se usan indistintamente en la presente.

Ejemplo 14.1

Fijación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T a líneas celulares de mieloma múltiple y células Jurkat-NFAT

Para medir la fijación a GPRC5D, se realizó un ensayo de fijación basado en citometría de flujo en líneas celulares de mieloma múltiple informadas (Lombardi et al., Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease; Genes Chromosomes Cancer. marzo de 2007;46(3):226-38.). La línea celular NCI-H929 (ATCC® CRL-9068) se cultivó en RPMI 1640 con medio Glutamax (Gibco) complementado con 10 % de FBS, 1x de penicilina/estreptomicina (Gibco), 1x de piruvato de sodio (Gibco) y beta-mercaptoetanol 50 μ M (Gibco). Se cultivaron células indicadoras Jurkat-NFAT (una línea celular indicadora de leucemia linfática aguda humana que expresa CD3 con un promotor NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega, N.° CS176501) en RPMI 1640, que contenía 2 g/l de glucosa, 2 g/l de NaHCO₃, 10 % de FCS, HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, 1 x NEAA, 1 x piruvato de sodio y 200 μ g/ml de higromicina B.

Se incubaron 0,1 millones de células por cavidad de una placa de 96 cavidades de fondo redondo con de 100 nM a 1,3 pM (diluciones en serie de 1:5) de los constructos de GPRC5D-TCB indicados 5E11p-CH2527, 6625, 6626, 5F11p-CH2527, 6623 o 6624 o sin constructo durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron con amortiguador FACS (PBS, 2 % de suero bovino fetal; 1 % de EDTA 0,5m pH 8; 0,25 % de NaN₃ azida de sodio (20 %)) dos veces y se tiñeron con anticuerpo específico de fragmento Fc γ anti-IgG humana de cabra conjugado con PE (Jackson Laboratories, 109-606-008) diluido a 1/100 en amortiguador FACS durante 30 min adicionales a 4 °C.

Se realizó una adquisición de citometría de flujo en un BD Biosciences Fortessa diseñado de manera personalizada y se la analizó con BD Diva. Se calcularon valores de EC50 con el software GraphPad Prism.

La Figura 16 muestra que todas las moléculas de TCB son capaces de fijarse tanto a GPRC5D humano como a CD3 humano de una manera dependiente de la concentración. Sucintamente, ambas versiones humanizadas de 5E11p-CH2527, concretamente 6625 y 6626, muestran una fijación mejorada a GPRC5D humano en comparación con su TCB parental, lo que da también como resultado menores valores de EC50 de fijación (Figura 16A y Tabla 14.1). Además, 6624 muestra una fijación levemente mejorada a GPRC5D humano en comparación con 5F11p-CH2527 y 6623 (Figura 16B). En general, todas las

moléculas a base de 5F11 muestran una mejor fijación a GPRC5D humano que las moléculas a base de 5E11. Todas las moléculas de TCB a base de 5E11 muestran una fijación dependiente de la concentración comparable a CD3 humano (Figura 16C), mientras que ambas variantes de humanización de 5F11p-CH2527, concretamente 6623 y 6624, muestran señales de fijación en general más fuertes a las concentraciones de anticuerpo más altas en comparación con la parental, cuando se incuban con células Jurkat-NFAT que expresan CD3 humano (Figura 16D).

Tabla 14.1: Valores de EC50 (nM) para la fijación de las moléculas de GPRC5D-TCB indicadas ya sea a GPRC5D humano expresado en NCI-H929 o a CD3 humano expresado en células Jurkat.

EC50 (nM)	5E11p-CH2527	6625	6626	5F11p-CH2527	6623	6624
NCI-H929	3,36	1,15	0,85	0,18	0,36	0,1
Jurkat	3,67	11,47	7,8	2,31	n.c.	n.c.

Ejemplo 14.2

Fijación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T a líneas celulares de mieloma múltiple

Como los datos presentados en el Ejemplo 14.1 se calcularon erróneamente con un factor de 10, los valores de EC50 son demasiado bajos. Por lo tanto, y para reevaluar la fijación a GPRC5D, se realizó una serie de ensayos de fijación basados en FACS en líneas celulares de mieloma múltiple informadas (Lombardi et al., Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease; Genes Chromosomes Cancer. Marzo de 2007;46(3):226-38). La línea celular OPM-2 se cultivó en RPMI 1640 + 1 % de medio Glutamax (Gibco) complementado con 20 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco) inactivado por calor. La línea celular NCI-H929 se cultivó en RPMI 1640 + 1 % de medio Glutamax (Gibco) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco) inactivado por calor, mercaptoetanol 50 μ M (Gibco) y piruvato de sodio 1 mM (Gibco), y RPMI-8226 se cultivó

en RPMI 1640 + 1 % de medio Glutamax (Gibco) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco) inactivado por calor. Las líneas celulares se cultivaron en matraces de 75 cm² (TPP) con dos pasadas por semana.

Sucintamente, se recolectaron células de suspensión, se las contó y se las evaluó para determinar su viabilidad. Todas las etapas posteriores se realizaron a 4 °C.

Las células se volvieron a suspender en PBS a 0,5 millones de células por ml. A continuación, 0,05 millones de células se colocaron en cada cavidad de una placa de 96 cavidades de fondo redondo y se centrifugaron, y se descartaron los sobrenadantes. Las células se tiñeron con tinte de viabilidad Zombie Aqua (BioLegend, N.º 423102, prediluido a razón de 1:400), que contenía bloqueo de Fc (BioLegend, N.º 422302, prediluido a razón de 1:400) durante 20 minutos en un volumen total de 50 µl por cavidad. Las células se lavaron con amortiguador FACS y se incubaron con concentraciones crecientes del 5E11(6625)-TCB, también denominado 6625 en la presente, (0,7 nM - 500 nM, volumen total de 25 µl por cavidad) durante 30 minutos a 4 °C. Las placas del ensayo se centrifugaron y se descartaron los sobrenadantes.

A partir de ahí, las células se volvieron a suspender mediante agitación por vórtice suave y se incubaron durante 30 min adicionales a 4 °C en un total de 25 µl por cavidad, que contenía 500 nM del anticuerpo secundario (aPGLALA mulG2b Alexa 647, producido internamente) en amortiguador FACS. Las células se lavaron una vez y se analizaron en un citómetro de flujo BD, equipado con FACS Diva. Se obtuvieron curvas de fijación y valores de EC50 con GraphPadPrism6. Los valores de EC50 de la réplica de ensayo 1 corresponden a los gráficos mostrados en la Figura 25A, la Figura 25B y la Figura 25C. Los valores de EC50 de la réplica de ensayo 2 corresponden a los gráficos mostrados en la Figura 25D, la Figura 25E y la Figura 25F. Los valores de EC50 de la réplica de ensayo 3 corresponden a los gráficos mostrados en la Figura 25G, la Figura 25H y la Figura 25I.

La Figura 25 muestra la fijación dependiente de la concentración del 5E11(6625)-TCB a líneas celulares de MM que expresan diversos niveles de GPRC5D humano. La EC50 de fijación varía de 20 nM a 158 nM y muestra alguna variación de ensayo debido a la variación de los niveles de expresión de la diana en las células.

Tabla 14.2. Valores de EC50 Fijación de 5E11(6625)-TCB a GPRC5D humano expresada en diferentes líneas celulares de MM establecidas

EC50 (nM)	OPM-2	NCI-H929	RPMI-8226
Réplica de ensayo 1	34,5	75,8	26,8
Réplica de ensayo 2	75,5	~123,2	20,4
Réplica de ensayo 3	54,2	~158,2	55

Ejemplo 15

Se evaluó la capacidad de los GPRC5D-TCB para inducir la activación mediada por CD3 de células efectoras Jurkat-NFAT tras la fijación simultánea a CD3 humano y GPRC5D humano mediante el uso de cocultivos de células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155) y células indicadoras Jurkat-NFAT (Promega, N.º CS176501). Tras la fijación simultánea de la molécula de TCB al GPRC5D humano en las células RPMI-8226 y el antígeno CD3 humano en células indicadoras Jurkat-NFAT, el promotor NFAT se activa y produce la expresión de luciferasa de luciérnaga activa. La intensidad de la señal de luminiscencia (obtenida tras la adición de sustrato de luciferasa) es proporcional a la intensidad de la activación y señalización de CD3.

Para el ensayo, se colocaron 20.000 células RPMI8226 en cada cavidad de una placa de 96 cavidades y se agregaron las moléculas de TCB indicadas para obtener un rango de concentración final de 50 nM a 5 fM, mediante etapas de dilución en serie de 1:10 en RPMI, que contenían 20 % de FBS y 1 % de pen/estrep. Se agregaron 50.000 células Jurkat-NFAT por cavidad para obtener una relación E:T final de 2,5:1. Después de una incubación durante la noche a 37 °C con 5 % de CO₂, se agregaron 100 µl de reactivo ONE-Glo (Promega) a volúmenes equivalentes del sobrenadante del ensayo y se los incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, a resguardo de la luz. Se analizó la luminiscencia con un lector de placas Perkin Elmer.

Como se ilustra en la Figura 17A, todas las moléculas de GPRC5D TCB evaluadas inducen la activación de Jurkat-NFAT de manera dependiente de la dosis, mientras que no se obtuvo señal significativa alguna en presencia de cualquiera de las dos moléculas de control de DP47 TCB no dirigidas. El DP47 TCB 1 no dirigido comprende un aglutinante de CD3 que comprende la VH de SEQ ID NO: 104 y la VL de SEQ ID NO: 105. El DP47 TCB 2 no dirigido comprende un aglutinante de CD3 que comprende la VH de SEQ ID NO: 35 y la VL de SEQ ID NO: 36. Los valores de EC50 correspondientes

para la activación de Jurkat se calcularon con GraphPadPrism6 y se proporcionan en la Tabla 15. Tomando en cuenta ambas EC₅₀, así como el AUC (ver la Tabla 15), la clasificación de las moléculas es la siguiente: 6624 > 6623 > 5F11p-CH2527 > 6626 ~6625 > 5E11p-CH2527.

Se realizaron ensayos similares en presencia de líneas celulares (de mieloma múltiple) adicionales, que expresaban diversos niveles de GPRC5D humano, determinados mediante flujo (Quantum Simply Cellular, Bangslabs) e indicados como números de sitio de fijación a GPRC5D entre paréntesis después del nombre de la línea celular.

Se calcularon EC₅₀ y AUC con GraphPadPrism y se los grafica en ejes x e y (Figuras 17B-G).

Como se muestra en las Figuras 17B-G, todas las moléculas muestran una activación de Jurkat dependiente de la concentración en presencia de líneas celulares con un amplio rango de expresión de GPRC5D relativa; la clasificación de las moléculas es similar, independientemente de la línea celular diana presente.

Tabla 15: Valores de EC₅₀ (pM) o área bajo la curva (AUC), calculados a partir de la activación mediada por GPRC5D-TCB de células indicadoras Jurkat-NFAT en presencia de células RPMI-8226, según lo medido mediante luminiscencia después de incubación durante la noche (~20 h).

	5E11p-CH2527	6625	6626	5F11p-CH2527	6623	6624
EC₅₀ (pM)	157	40	49,7	14,0	8,9	4,5
AUC	265 250	571 600	582 400	393 460	778 140	880 720

Ejemplo 16

Citotoxicidad de linfocitos T mediada por GPRC5D-TCB

Para medir adicionalmente la funcionalidad de los anticuerpos TCB anti-GPRC5D, se realizó un ensayo *in vitro* de lisis de células tumorales. Sucintamente, se cocultivaron

líneas celulares AMO-1 (DSMZ ACC 538), NCI-H929 ATCC® CRL-9068, LP-1 (DSMZ ACC 41) e IM-9 (ATCC® CCL-159) con linfocitos T pan humanos como células efectoras a una relación final de efector con respecto a diana de 10:1. Se aislaron linfocitos T pan humanos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos, con un kit de aislamiento de linfocitos T Pan humanos (Miltenyi Biotec). Las moléculas biespecíficas de activación de linfocitos T que se dirigen a GPRC5D (6625 y B72) o BCMA indicadas se agregaron a concentraciones decrecientes (rango de entre 50 nM y 5 pM, con etapas de dilución de 1:10). Se incluyó el TCB no dirigido como control negativo.

Después de 20 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, se determinó la muerte celular mediante cuantificación de la señal de luminiscencia (ensayo de citotoxicidad CytoTox-Glo, Promega), de acuerdo con el manual del fabricante. Se presentan señales de luminiscencia relativa (RLU) como medición directa de la muerte celular determinada. Se calcularon EC50 y AUC con GraphPadPrism, y se las resume en la Tabla 16.

Las Figuras 18A-D muestran que todas las moléculas de TCB son capaces de inducir la lisis dependiente de la concentración de un amplio rango de líneas de células tumorales con un nivel variable de expresión relativa de BCMA y GPRC5D humanos, respectivamente. La comparación directa de 6625 y B72 sugiere una mayor eficacia y potencia de la molécula 6625. La comparación de 6625 y BCMA-TCB muestra una mejor eficacia y potencia in vitro de 6625 en presencia de AMO-1 (Figura 18A), NCI-H929 (Figura 18B) y LP-1 (Figura 18C), mientras que BCMA-TCB induce una lisis de células tumorales más fuerte de IM-9 (Figura 18D), que expresa niveles bastante bajos de GPRC5D. La clasificación diferente de 6625 y BCMA-TCB en las líneas celulares evaluadas puede explicarse probablemente mediante los diferentes niveles de expresión relativa de GPRC5D en comparación con BCMA en estas líneas celulares.

Tabla 16: Valores de EC50 (pM), calculados a partir de lisis de células tumorales mediada por GPRC5D- o BCMA-TCB en presencia de las líneas celulares indicadas y según lo determinado mediante luminiscencia después de incubación durante la noche (~20 h).

EC50 (pM)	Indicación de tumor	6625	B72	BCMA-TCB
AMO-1	plasmacitoma	8,3	79,9	137,1
NCI-H929	MM	0,597	26,95	171
LP-1	MM	7,99	48,95	76,36
IM-9	Linfoblastoide B de un paciente con MM	266,9	197,5	55,69

Tabla 17: Valores de área bajo la curva, calculados a partir de lisis de células tumorales mediada por GPRC5D- o BCMA-TCB en presencia de las líneas celulares indicadas y según lo determinado mediante luminiscencia después de incubación durante la noche (~20 h).

AUC	Indicación de tumor	6625	B72	BCMA-TCB
AMO-1	plasmacitoma	80117761	54494020	47326610
NCI-H929	MM	17872547	10854134	10684467
LP-1	MM	15438497	11504124	11100680
IM-9	Linfoblastoide B de un paciente con MM	9268093	8600921	10994563

Ejemplo 17

Activación de linfocitos T mediada por TCB anti-GPRC5D en presencia de una muestra de MM primario

Para evaluar la actividad de moléculas de GPRC5D TCB en muestras de mieloma múltiple primario, se descongeló una muestra de médula ósea sin procesar congelada (Proteogenex) y se realizó una rápida lisis de glóbulos rojos, con amortiguador de lisis BD Pharm (N.º 555899). A partir de ahí, las células se lavaron, se volvieron a suspender en

RPMI 1640 Glutamax, que incluía 20 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 % de suero humano y 1 % de penicilina/estreptomicina (de Gibco en todos los casos), y se colocaron 100 µl de suspensión celular (30.000 células) en cada cavidad de una placa de 96 cavidades con fondo redondo (TPP). Se agregaron linfocitos T autólogos para obtener una relación final de 10 linfocitos T por célula de la muestra mezclada de BM. Las moléculas indicadas se agregaron para obtener un rango de concentración final de 50 nM a 0,05 nM (etapas de dilución 1:10) en un volumen total de 200 µl por cavidad de una placa de 96 cavidades.

Después de incubación durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada, las células se lavaron con PBS una vez y se tiñeron durante 20 minutos a 4 °C con 50 µl de azul vivo (Invitrogen, N.º L23105) para discriminar entre células vivas y muertas. Se realizó una tinción superficial con una mezcla de los siguientes anticuerpos en función de las sugerencias del fabricante: CD25 BV605, CD69 APC-Cy7, CD38 BV510, CD138 FITC, CD8 BV711, CD3 PE-Cy5 y CD4 AlexaFluor700 (de BioLegend en todos los casos). Para el análisis final, las células se volvieron a suspender en 100 µl de amortiguador FACS y se adquirieron con un Fortessa (BD Biosciences). La Figura 19 muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, según lo determinado por el porcentaje de linfocitos T CD8 vivos que es positivo al marcador de activación temprana CD69. La EC50 de la activación de linfocitos T se calculó mediante Graph Pad Prism y se resume en la Tabla 18. Ambas moléculas biespecíficas que se dirigen a GPRC5D representativas, concretamente 6624 y 6625, son capaces de inducir una activación de linfocitos T dependiente de la concentración con una EC50 de 1,06 pM y 14,8 pM, respectivamente, mientras que no se indujo activación de linfocitos T alguna en presencia de un control de TCB no dirigido. En el caso ilustrado, los BCMA-TCB activaron los linfocitos T en un grado menor que las dos moléculas de GPRC5D TCB evaluadas. Una razón posible pueden ser las diferencias en los niveles de expresión relativa de GPRC5D y BCMA (sin evaluar). La molécula de B72 indujo una activación significativa de linfocitos T solo a concentraciones mucho mayores, en comparación con la observada con 6624 y 6625, aunque B72 produjo una activación general mayor en las dos concentraciones más altas medidas. Como se observó una activación de linfocitos T a concentraciones similares de B72 en muestras de médula ósea de pacientes sanos, no está claro si el efecto observado de B72 en presencia de las muestras de MM primario depende exclusivamente de la diana (ver la Figura 21).

Tabla 18: Valores de EC50 (pM), calculados a partir de la activación mediada por GPRC5D- o BCMA-TCB de linfocitos T autólogos, incubados con una muestra de MM

primario y cuantificados mediante análisis de citometría de flujo de CD69 en linfocitos T CD8 después de aproximadamente 24 h.

	6624	6625	B72	BCMA-TCB
EC50 (pM)	1,06	14,8	~612,5	52,54

Ejemplo 18

Disminución de linfocitos B tras la incubación de PBMC de donantes sanos

Se aislaron PBMC humanas de la sangre de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad clásica. Se colocaron 200.000 PBMC por cavidad de una placa de 96 cavidades en medio RPMI 1640, que contenía 10 % de FBS y 1 % de pen/estrep. Las moléculas biespecíficas indicadas se agregaron para obtener una concentración final de 50 nM, 5 nM, 0,5 nM o 0,05 nM en un volumen total de 200 µl por cavidad. Después de incubar durante 48 h a 37 °C en una incubadora humidificada, las células se lavaron con amortiguador FACS y los receptores Fc se bloquearon mediante la incubación de las células con Human TruStain FcX™ (bloqueo de Fc, BioLegend), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se utilizó azul vivo (Invitrogen, N.º L23105) para discriminar entre células vivas y muertas (ver el Ejemplo 17). Se realizó la expresión superficial de los siguientes marcadores durante 30 min a 4 °C: CD19, CD45, CD4, CD38, CD8, CD138 (de BioLegend en todos los casos). Para la cuantificación absoluta de linfocitos B por cavidad, se agregaron 10 µl por cavidad de microesferas de recuento absoluto CountBright (Invitrogen, N.º C36950) antes de un análisis de citometría de flujo con BD FACS Fortessa. Las Figuras 20A-D muestran el resumen de 5 donantes sanos diferentes, los cuales se han evaluado con las moléculas biespecíficas indicadas a diferentes concentraciones de anticuerpo, concretamente 50 nM (Figura 20A), 5 nM (Figura 20B), 0,05 nM (Figura 20C) y 0,05 nM (Figura 20D). Se ilustra el recuento de linfocitos B, normalizado con respecto a los controles no tratados, en función de duplicados con SD (por donante). Se observó una disminución significativa de linfocitos B sanos en el caso tanto del BCMA-TCB como del GPRC5D-TCB 6626, mientras que ninguno de los otros TCB dirigidos a GPRC5D, incluso B72, disminuyó significativamente los linfocitos B en la mayoría de los donantes. El efecto de disminución de linfocitos B observado con 6626 se limitó a concentraciones mayores de ~5 nM, mientras que BCMA-TCB disminuyó los linfocitos B sanos ya a concentraciones de 0,05 nM. En resumen, esto sugiere que las

moléculas dirigidas a GPRC5D parecen tener un riesgo mucho menor de disminuir los linfocitos B sanos, lo cual podría ser una ventaja de seguridad.

Ejemplo 19

Impacto sobre la activación de linfocitos T tras la incubación de muestras de médula ósea de donantes sanos

Se evaluó médula ósea sin procesar de donantes sanos (Lonza) 1 día después del muestreo. Después de una rápida lisis de glóbulos rojos con amortiguador de lisis BD Pharm N.º 555899, las células se lavaron, se volvieron a suspender en RPMI 1640 Glutamax, que incluía 20 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 % de suero humano y 1 % de penicilina/estreptomicina (de Gibco en todos los casos), y se colocaron 100 µl de suspensión celular (30.000 células) en cada cavidad de una placa de 96 cavidades con fondo redondo (TPP). Las moléculas indicadas se agregaron para obtener un rango de concentración final de 5 nM a 0,05 nM (etapas de dilución 1:10) en un volumen total de 200 µl por cavidad de una placa de 96 cavidades.

Después de incubación durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada, las células se lavaron con PBS una vez y se tiñeron durante 20 minutos a 4 °C con 50 µl de azul vivo (Invitrogen, N.º L23105) para discriminar entre células vivas y muertas. Se realizó una tinción superficial con una mezcla de los siguientes anticuerpos en función de las sugerencias del fabricante: CD25 BV605, CD69 APC-Cy7, CD38 BV510, CD138 FITC, CD8 BV711, CD3 PE-Cy5 y CD4 AlexaFluor700 (de BioLegend en todos los casos). Para el análisis final, las células se volvieron a suspender en 100 µl de amortiguador FACS y se adquirieron con un Fortessa (BD Biosciences). La Figura 21 muestra la activación de linfocitos T, determinada como porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (A) o CD4⁺ (B) CD69 positivos, tras los tratamientos indicados.

Se detectó una clara activación de linfocitos T dependiente de la concentración en la muestra de médula ósea con BCMA-TCB o B72, pero no con 6624 o 6625. Esto ilustra una potencial ventaja de seguridad de moléculas tales como la 6624 y la 6625 en comparación con BCMA-TCB o B72, cuando se usan a dosis mayores.

Ejemplo 20

Liberación de citocinas en sangre entera humana de donantes sanos

Se recolectó sangre entera de 6 donantes sanos en tubos de litio-heparina BD Vacutainer

y se la analizó dentro de las 3 horas. Los GPRC5D-TCB 6624 y 6625, así como la molécula de control de TCB no dirigida, se diluyeron en PBS (Gibco, N.º 14190) y se agregaron 5 µl a 195 µl de sangre entera en una placa de 96 cavidades de fondo redondo (Corning, Costar N.º 3799) para alcanzar concentraciones finales de 50, 0,5 y 0,005 nM. Los anticuerpos monoclonales Gazyva (obinutuzumab) y Lemtrada (alemtuzumab) se analizaron de manera similar a 50, 0,5 y 0,005 nM, mientras que Erbitux (cetuximab) se evaluó a 50 nM. PBS solo se usó como control de vehículo. Después de 24 h de incubación a 37 °C, la placa se centrifugó a 1800 g (3000 rpm) durante 5 min. Los sobrenadantes de plasma (~70 µl) se recolectaron y almacenaron a -80 °C antes de realizar una detección de citocinas multiplex con un kit Millipore (HCYTOMAG-60K) y un lector LX 200 de Luminex, de acuerdo con las sugerencias del fabricante. Como se resume en la Figura 22A (TNFα humano) y la Figura 22B (IL-6 humana), 6624 indujo la secreción de niveles bajos de TNFα e IL-6 en un rango similar a Gazyva, mientras que 6625 indujo niveles aun menores de las citocinas evaluadas, lo que sugiere que 6624 puede presentar un perfil de seguridad favorable en lo que respecta a la liberación de citocinas.

Ejemplo 21

Eficacia *in vivo* de diferentes moléculas de TCB biespecíficas contra GPRC5DxCD3 en NCI-H929 (ratones hNSG)

Para evaluar adicionalmente la eficacia de las moléculas de GPRC5D TCB 6623, 6624, 6625 y 6626, se analizó su potencial para inducir una regresión tumoral en ratones NSG completamente humanizados que tenían mieloma múltiple. 2,5 x10⁶ células NCI-H929 con una viabilidad de >95,0 % se volvieron a suspender en medio de cultivo celular RPMI (Gibco) y GFR matrigel (1:1, volumen total de 100 µl) y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG hembra humanizados (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ).

La humanización de los ratones se realizó de la siguiente manera: con 4-5 semanas de vida al comienzo del experimento (criados en Charles River, Lyon, Francia), los ratones se mantuvieron en una condición libre de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con pautas estrictas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El gobierno local revisó y aprobó el protocolo de estudio experimental (ROB-55.2-2532.Vet_03-16-10). Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbren al nuevo entorno y para observarlos. Se llevó a cabo

de manera regular un monitoreo continuo de la salud. De acuerdo con el protocolo, los ratones NSG hembra recibieron una inyección por vía i.p. (intraperitoneal) de 15 mg/kg de Busulfán, seguida un día después por una inyección por vía i.v. de 1×10^5 células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 16-20 después de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones y esta se analizó mediante citometría de flujo para determinar si la humanización tuvo éxito. Los ratones injertados de manera eficaz se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento (n=10/grupo).

En ese momento, los ratones recibieron una inyección por vía subcutánea de células tumorales como se describió anteriormente y se trataron una vez por semana con los compuestos o PBS (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó una mediana de tamaño de 308 mm³ (rango de 92 - 841 mm³). Todos los ratos recibieron una inyección por vía intravenosa de 0,05 mg/kg y 0,005 mg/kg de las moléculas de TCB indicadas (ver las Figuras 23A y 23B).

Para obtener la cantidad adecuada de los compuestos, se diluyeron soluciones de reserva con amortiguador de histidina (histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0). El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana con un calibre y el volumen tumoral se calculó de la siguiente manera:

$$T_v: (W^2/2) \times L \quad (W: \text{ancho}, L: \text{longitud})$$

El estudio terminó el día 41 después de la inoculación de las células tumorales, todos los ratones se sometieron a eutanasia después de tres inyecciones de los compuestos y se extirparon y pesaron los tumores. Se realizaron estadísticas de acuerdo con anova de dos vías, prueba de Tukey.

Como se ilustra en las Figuras 23A y 23B, a la dosis baja de 0,005 mg/kg, ningunas de las moléculas de GPRC5D-TCB evaluadas mostró una inhibición eficaz del crecimiento tumoral. Por el contrario, a 0,05 mg/kg, se observaron respuestas significativas al crecimiento tumoral por parte de las cuatro moléculas de GPRC5D TCB evaluadas en comparación con el grupo de vehículo. Las Figuras 23C-G demuestran adicionalmente la inhibición del crecimiento tumoral de los ratones individuales por grupo de tratamiento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las cuatro moléculas evaluadas, lo que valida la alta eficacia preclínica de las cuatro moléculas de GPRC5D TCB.

Ejemplo 22

SDPK *in vivo* en ratones hFcRn Tg y KO

Para evaluar las propiedades PK de las moléculas de GPRC5D TCB 6623, 6624, 6625 y 6626, las moléculas respectivas se administraron por vía intravenosa (bolo) en la vena de la cola a una dosis de 1 mg/kg ya sea en ratones línea +/- huFcRn Tg 32 (B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)32Dcr) o +/- muFcRn (B6.129X1-Fcgrttm1Dcr/DcrJ) (JAX laboratories, Bar harbor, EE. UU.). Todos los estudios se realizaron con la aprobación de la autoridad veterinaria local y en cumplimiento estricto de las regulaciones federales suizas sobre la protección de los animales y de las normas de la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Se recolectó sangre mediante punción venosa (vena de la cola) en diferentes puntos temporales para obtener suero para análisis en los puntos temporales posteriores a la dosis indicados: 0,083, 7, 24, 48, 72, 168, 336, 504 y 672 después de la dosis para la línea +/- huFcRn Tg y 32, 0,083, 2, 7, 24, 31, 48, 72 y 96 horas después de la dosis para la línea +/- muFcRn. La sangre se almacenó durante 20 minutos a temperatura ambiente para su coagulación y se obtuvo suero mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 5 min a 4 °C, y se lo congeló inmediatamente. Todas las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta que se las analizó mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), un método específico para la porción de Fab humano del anticuerpo administrado y sus variantes.

Brevemente, las muestras, diluidas previamente con amortiguador de ensayo, se incubaron con moléculas de captura y detección durante 9 min a 37 °C. Se utilizó mAb<H-Fab(kappa)>M-IgG-Bi biotinilado como molécula de captura y se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón mAb<H-Fab(CH1)>M-1.19.31-IgG-S-Ru etiquetado con rutenio(II)tris(bipiridil)32+ para la detección. Se agregaron micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y se las incubó durante 9 min adicionales a 37 °C para permitir la formación de complejos a causa de las interacciones de biotina-estreptavidina. Los complejos se capturaron magnéticamente en un electrodo y una señal quimioluminiscente generada con el correactivo tripropilamina (TPA) se midió con un detector fotomultiplicador. Todas las muestras de suero y las muestras de control positivo o negativo se analizaron en cuadruplicados y se calibraron en función del anticuerpo correspondiente que se administró.

Como se ilustra en la Figura 24 y la Tabla 19, las cuatro moléculas de GPRC5D TCB

presentan un perfil PK aceptable en ratones hFcRn tg32 en el rango del de una IgG clásica. Los datos generados en ratones FcRn KO se consideran relevantes para evaluar la absorción celular no específica, la cual podría estar ligada a la inmunogenicidad. Como se resume en la Figura 10B, 6625 y 6626 muestran velocidades de depuración comparables, mientras que las de 6623 y 6624 están elevadas, lo que sugiere un potencial levemente mayor de absorción celular no específica.

Tabla 19: Depuración, semivida respectiva calculadas a partir de estudio de SDPK en ratones hFcRn Tg32 o FcRn KO

	Ratones hFcRn Tg32		Ratones FcRn KO	
Molécula	Depuración (ml/d/kg)	Semivida (d)	Depuración (ml/d/kg)	Semivida (d)
6623	13,6	5,6	97,3	0,3
6624	22,5	6,2	143	0,6
6625	13,0	7,2	61,3	1,2
6626	9,6	7,3	57,8	1,1

* * *

Si bien la invención anterior se describió con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a fin de que se entienda mejor, ni las descripciones ni los ejemplos deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y literatura científica citadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.