

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GPRC5D Y USOS DE LOS MISMOS

ANTECEDENTES

El miembro D del grupo 5 de la familia C de receptores acoplados a proteína G (GPRC5D) es miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. GPRC5D es una proteína transmembrana. Se observó sobreexpresión de GPRC5D en pacientes con mieloma múltiple. En particular, su alta expresión tuvo una correlación significativa con el mal resultado de la enfermedad y el tratamiento.

Dada su alta expresión específica en células malignas, se ha propuesto que los anticuerpos que son específicos de GPRC5D pueden ser útiles para tratar la malignidad, como por ejemplo a través de un anticuerpo biespecífico de redirección de células T, o a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

SUMARIO

En el presente documento se descubren anticuerpos anti-GPRC5D, incluyendo sus derivados humanizados, que tienen una gran afinidad por la proteína GPRC5D humana. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden dirigirse a las células cancerosas que expresan GPRC5D, y por lo tanto pueden usarse para tratar el cáncer, en particular el cáncer hematológico.

Una realización de la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene especificidad de unión a una proteína miembro D del grupo 5 de la familia C de receptores acoplados a proteína G humana (GPRC5D), en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2, y CDRH3 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3. En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, comprenden: (a) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:29-34; (b) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42-47; (c) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:54-59; o (d) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:68-73.

En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:29-34. En algunas realizaciones, la VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:7 y 35-37, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:8 y 38-41. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38.

En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42-47. En algunas realizaciones, la VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:9 y 48-50, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:10 y 51-53. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51.

En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:54-59. En algunas realizaciones, la VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:61-64, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16 y 65-67. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65.

En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:68-73. En algunas realizaciones, la VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:1 y 74-79, y la VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO:2 y 80-86. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es competente en ADCC.

También se proporciona, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo que comprende además un fármaco citotóxico conjugado con el anticuerpo o fragmento del mismo.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico, que comprende el fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación, y un segundo fragmento de unión a antígeno que tiene especificidad por una segunda proteína diana. En algunas realizaciones, la segunda proteína diana se selecciona del grupo que consiste en CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 y 4-

1BB. En algunas realizaciones, la segunda proteína diana es CD3. En algunas realizaciones, la segunda proteína diana es 4-1BB.

También se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente descripción. También se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende (a) tratar una célula T, una célula asesina natural (NK) o un macrófago, *in vitro*, con el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente descripción, y (b) administrar la célula tratada al paciente.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico, tal como un cáncer de células B que expresa GPRC5D (por ejemplo, mieloma múltiple).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la unión de anticuerpos murinos recogidos del sobrenadante de hibridoma a GPRC5D expresado en células CHO-K1.

La **Figura 2** muestra la unión de anticuerpos quiméricos a GPRC5D expresados en células CHO-K1.

La **Figura 3** muestra que la unión de anticuerpos indujo endocitosis.

La **Figura 4** muestra que los anticuerpos eran competentes para ADCC.

Las **Figuras 5-8** muestran los resultados de las pruebas de afinidad de los anticuerpos humanizados derivados de 6G10D9, 58F9G10, 34D3H1, y 37B9C4, respectivamente.

La **Figura 9** confirma la unión de anticuerpos humanizados seleccionados a GPRC5D expresados en células CHO-K1.

La **Figura 10** confirma la unión de anticuerpos humanizados seleccionados a GPRC5D expresados en células NCI-H929.

La **Figura 11** muestra la eficacia de ADCC de los anticuerpos humanizados sometidos a prueba.

La **Figura 12** muestra la actividad de inducción de internalización de los anticuerpos humanizados sometidos a prueba.

La **Figura 13** muestra las actividades de eliminación de células de los conjugados anticuerpo-fármaco sometidos a prueba.

La **Figura 14** muestra las actividades de inhibición tumoral del anticuerpo sometido a prueba.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Resulta importante señalar que el término "un" o "una" en relación con una entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que el término "un anticuerpo"

representa uno o más anticuerpos. Como tales, los términos "un", "uno" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en la presente.

Tal tal como se usa en la presente, se pretende que el término "polipéptido" abarque el singular, "polipéptido", así como el plural, "polipéptidos" y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unida linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, se incluyen en la definición de "polipéptido" los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas", "cadenas de aminoácidos" o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de o indistintamente con cualquiera de estos términos. Se pretende que el término "polipéptido" también haga referencia a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido que incluyen, sin carácter limitante, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueadores/protectores conocidos, escisión proteolítica o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede obtenerse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier forma, incluyendo por síntesis química.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de coincidencias o posiciones homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40% de identidad, aunque preferentemente menos del 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

Un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene un porcentaje determinado (por ejemplo, el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) La "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo al comparar las dos secuencias.

El término "un ácido nucleico o polinucleótido equivalente" se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o complemento del mismo. Se pretende que un homólogo de un ácido nucleico de doble cadena incluya ácidos

nucleicos que tengan una secuencia de nucleótidos que tenga un cierto grado de homología con o con su complemento. En un aspecto, los homólogos de ácidos nucleicos pueden deshibridarse con el ácido nucleico o su complemento. Asimismo, "un polipéptido equivalente" se refiere a un polipéptido que tiene cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia. En algunos aspectos, la identidad de secuencia es de al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. En algunos aspectos, el polipéptido o polinucleótido equivalente tiene una, dos, tres, cuatro o cinco adiciones, deleciones, sustituciones y combinaciones de los mismos en comparación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. En algunos aspectos, la secuencia equivalente retiene la actividad (por ejemplo, unión a epítipo) o estructura (por ejemplo, puente salino) de la secuencia de referencia.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" o "polipéptido de unión a antígeno" se refiere a un polipéptido o un complejo polipeptídico que reconoce específicamente y se une a un antígeno. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión a antígeno o una sola cadena del mismo. Así, el término "anticuerpo" incluye cualquier proteína o molécula que contenga un péptido que comprenda al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina que tenga actividad biológica de unión al antígeno. Los ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, un entramado (FR), o cualquier parte de la misma, o al menos una parte de una proteína de unión.

Los términos "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno", tal como se usa en el presente documento, es una porción de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. El término "fragmento de anticuerpo" incluye aptámeros, spiegelmers y diacuerpos. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o modificada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo.

Un "fragmento variable monocatenario" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de las inmunoglobulinas. En algunos aspectos, las regiones se conectan con un péptido enlazador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador puede ser rico en glicina para flexibilidad, así como en serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el N-terminal de la VH con el C-terminal de la VL, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina

original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador. Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5,892,019.

El término anticuerpo abarca diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, γ I- γ 4). La naturaleza de esta cadena es la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG₅, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles por los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente discusión generalmente se dirigirá a la clase de moléculas de inmunoglobulina IgG. En referencia a una IgG, una molécula de inmunoglobulina convencional comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23,000 Dalton y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53,000-70,000. Las cuatro cadenas están normalmente unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras sujetan a las cadenas pesadas que comienzan en la embocadura de la "Y" y continúan a lo largo de la región variable.

Los anticuerpos, polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítopos, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VK o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos LIGHT descritos en el presente documento). Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (K , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o una lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí y las porciones de "cola" de las

dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces covalentes disulfuro o mediante enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, células B o células hospedadoras modificadas por ingeniería genética. En la cadena pesada, la secuencia de aminoácidos discurre desde el extremo N-terminal en los extremos de horquilla de la configuración Y al extremo C-terminal en la parte inferior de cada una de las cadenas.

Las cadenas tanto ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las partes de cadena tanto ligera (VK) como pesada (VH) determinan la especificidad y el reconocimiento de antígenos. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CK) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales al sitio de unión al antígeno o al extremo amino terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y en la porción C-terminal se encuentra una región constante; los dominios CH3 y CK comprenden de hecho el extremo carboxilo de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca de manera selectiva y se una específicamente a epítomos sobre antígenos. Es decir, el dominio VK y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión al antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres CDR en cada cadena de la VH y VK (es decir, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). *Por ejemplo, en algunos casos*, en determinadas moléculas de inmunoglobulina procedentes de especies de camélidos o diseñadas por ingeniería genética basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en las cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, *por ejemplo*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

En anticuerpos que se producen de manera natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, citados como regiones "marco conservadas" muestran una menor variabilidad

intermolecular. Las regiones de entramado adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones marco conservadas actúan formando un armazón que posibilita el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercadena no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR situadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria fomenta la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo relacionado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones de entramado, respectivamente, pueden identificarse fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto habitual en la técnica, puesto que se han definido con precisión (véanse, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

En el caso en que existan dos o más definiciones de un término que se utilice y/o acepte dentro de la técnica, la definición del término, tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir todos estos significados, a menos que se establezca explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios no contiguos que se combinan con el antígeno y que se encuentran en la región variable de los polipéptidos de las cadenas tanto pesadas como ligeras. Esta región particular ha sido descrita por Kabat y col., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Las definiciones de CDR según Kabat y Chothia incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término según se define y utiliza en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la siguiente tabla como comparación. Los números de residuos exactos que incluyen una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular a partir de la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat *et al.* también han definido un sistema de numeración para secuencias del dominio variable que se puede aplicar a cualquier anticuerpo. Una persona normalmente versada en la materia puede asignar de manera unívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí. Tal como se utiliza en esta memoria, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración recogido por Kabat et al. U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

Además de la tabla anterior, el sistema numérico de Kabat describe las regiones CDR de la siguiente manera: CDR-H1 empieza en aproximadamente el aminoácido 31 (es decir, aproximadamente 9 residuos después del primer residuo de cisteína), incluye aproximadamente 5-7 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de serina. El CDR-H2 comienza en el decimoquinto residuo después del final de CDR-H1, incluye aproximadamente 16-19 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de arginina o lisina. CDR-H3 comienza en aproximadamente el treinta y tercer residuo de aminoácido después del final de CDR-H2; incluye 3-25 aminoácidos; y termina en la secuencia W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido. La CDR-L1 comienza aproximadamente en el residuo 24 (es decir, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 10-17 residuos; y termina en el próximo residuo de triptófano. El CDR-L2 comienza aproximadamente al decimosexto residuo después del final de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 residuos. CDR-L3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo después del final de CDR-L2 (es decir, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 7-11 residuos y termina en la secuencia F o W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En otra realización, la región variable puede ser constrictoide en origen (p.ej., de tiburones).

Tal como se usa en el presente documento, el término "región constante de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno para su uso en la divulgación puede comprender una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3; o una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH3. Además, un anticuerpo para usar en la divulgación puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Tal como se expuso anteriormente, un experto en la técnica entenderá que la región constante de la cadena pesada puede modificarse de modo que varíen en secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina natural.

La región constante de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento puede derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una región constante de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG₁ y una región bisagra derivada de una molécula IgG₃. En otro ejemplo, una región constante de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₄.

Tal como se usa en el presente documento, el término "región constante de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena ligera del anticuerpo. Preferentemente, la región constante de la cadena ligera comprende al menos uno de un dominio kappa constante o un dominio lambda constante.

Un "par de cadena ligera-cadena pesada" se refiere a la colección de una cadena ligera y una cadena pesada que pueden formar un dímero a través de un enlace disulfuro entre el dominio CL de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Tal como se ha indicado previamente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de

inmunoglobulina son bien conocidas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y la expresión "dominio CH1" incluye el primer dominio de región constante (más próximo al amino-terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 se encuentra adyacente al dominio VH y está en posición amino-terminal respecto de la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE, véase Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). El dominio CH2 es único, en tanto que no está estrechamente emparejado con otro dominio. En su lugar, se interponen dos cadenas de carbohidrato unidas en N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También se ha documentado exhaustivamente que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula e cadena pesada que enlaza el dominio CH1 con el domino CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo de este modo que las dos regiones de unión a antígeno N-terminales se muevan de manera independiente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, intermedio e inferior (*Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)*).

Tal como se usa en la presente, la expresión "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG de origen natural, las regiones CH1 y CK están unidas mediante un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" se referirá a cualquier anticuerpo en donde la región o sitio inmunorreactivo se obtiene o procede de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta o ser parcial o modificada de acuerdo con la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En

determinadas realizaciones, la región o el sitio de unión a diana será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

5 Tal como se usa en el presente documento, el "porcentaje de humanización" se calcula determinando el número de diferencias de aminoácidos del entramado (es decir, diferencia no CDR) entre el dominio humanizado y el dominio de la línea germinal, restando ese número del número total de aminoácidos, y luego dividiendo que por el número total de aminoácidos y multiplicando por 100.

10 Por "se une específicamente" o "tiene especificidad por", generalmente se entiende que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a dicho epítipo mediante su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado aleatorio. El término "especificidad" se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa mediante la cual un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor por un epítipo dado que el anticuerpo "B" o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una mayor especificidad que la que tiene por el epítipo relacionado "D".

20 Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un trastorno o cambio fisiológico no deseado, tal como el avance de un cáncer. Los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, sin carácter limitante, el alivio de síntomas, la reducción del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, la ralentización o reducción del avance de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión (ya sea parcial o total), tanto detectables como no detectables. El "tratamiento" también se puede referir a la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos que son propensos a padecer la afección o trastorno, o aquellos en los que se ha de prevenir la afección o trastorno.

30 El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, al cual se desea aplicar una diagnosis, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos; animales domésticos;

35

animales de granja; animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas y demás.

Tal como se usa en el presente documento, frases como "a un paciente que necesita tratamiento" o "a un sujeto que necesita tratamiento" incluye sujetos, como mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo o la composición de la presente descripción utilizada, por ejemplo, para detección, para un procedimiento de diagnóstico y/o para tratamiento.

Anticuerpos anti-GPRC5D

Usando la tecnología de hibridoma, los ejemplos experimentales adjuntos mostraron que se obtuvieron varios anticuerpos murinos. Se secuenciaron catorce de los anticuerpos murinos y se fabricaron anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos humanizados presentaron potentes actividades de unión a GPRC5D y pudieron inducir endocitosis mediada por receptores. Las pruebas *in vivo* mostraron que estos anticuerpos eran activos para inducir ADCC e inhibir el desarrollo de tumores.

Cuatro de los anticuerpos murinos, 34D3H1, 37B9C4, 58F9G10 y 6G10D9, pasaron por el proceso de humanización. Algunos de los anticuerpos humanizados, incluyendo 6-H3L3, 6-H4L3 (ambos derivados de 6G10D9), 58-H1L1, 58-H3L1 (ambos derivados de 58F9G10), 34-H1L1 (derivados de 34D3H1) y 37-H1L1 (derivados de 37B9C4) se mostró además prometedora para el desarrollo clínico continuo.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, por lo tanto, se proporciona un fragmento de unión a un fragmento del mismo que tiene especificidad de unión a una proteína miembro D del grupo 5 de la familia C de receptores acoplados a proteína G humana (GPRC5D). El anticuerpo o fragmento del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2, y CDRH3 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3.

En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen (a) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 29-34; (b) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-47; (c) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:54-59, o SEQ ID NO:54, 60, y 56-59; o (d) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:68-73.

En una realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:29-34. Las secuencias de ejemplo para la VH incluyen SEQ ID NO: 7 y 35-37 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con cualquier SEQ ID NO: 7 y 35-37.

Las secuencias de ejemplo para la VL incluyen SEQ ID NO: 8 y 38-41 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con cualquier SEQ ID NO: 8 y 38-41.

5 En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:35. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:38.

10 También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38.

15 En una realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42-47. Las secuencias de ejemplo para la VH incluyen SEQ ID NO: 9 y 48-50 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 9 y 48-50. Las secuencias de ejemplo para la VL incluyen SEQ ID NO: 10 y 51-53 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con cualquier SEQ ID NO: 10 y 51-53.

20 En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:48. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:51.

25 También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51.

30
35

En una realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:54-59. Las secuencias de ejemplo para la VH incluyen SEQ ID NO: 61-64 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 61-64. Las secuencias de ejemplo para la VL incluyen SEQ ID NO: 16 y 65-67 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 16 y 65-67.

En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:61. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:65.

También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65.

En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:63. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:65.

También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65.

En una realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:54, 60, y 56-59. Las secuencias de ejemplo para la VH incluyen SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO15. Las

secuencias de ejemplo para la VL incluyen SEQ ID NO: 16 y 65-67 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 16 y 65-67.

5 En una realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 68-73. Las secuencias de ejemplo para la VH incluyen SEQ ID NO: 1 y 74-79 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y 74-79. Las secuencias de ejemplo para la VL incluyen SEQ ID NO: 2 y 80-86 o una
10 secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 y 80-86.

En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:76. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82 o una
15 secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:82.

También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos
20 anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

En una realización, la VH incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID
25 NO:77. En una realización, la VL incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82 o una secuencia que tiene al menos el 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:82.

También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo en FAP α que cualquiera de estos anticuerpos. También se proporcionan, en algunas realizaciones, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con cualquiera de estos
30 anticuerpos en la unión a FAP α , como uno que tiene una VH que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y una VL que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

35

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es competente en ADCC. Se conocen en la técnica métodos y materiales adecuados para hacer que un anticuerpo sea competente para la ADCC, como usar los fragmentos Fc apropiados o disminuir/eliminar la fucosilación.

5 En algunas realizaciones, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, incluyen (a) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:29-34; (b) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:42-47; (c) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:54-59, o SEQ ID NO:54, 60, y 56-59; o (d) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:68-73, en donde cada una de las secuencias de CDR enumeradas incluye una, dos o tres
10 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina),
15 cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina,
20 triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se reemplaza preferentemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, una hilera de aminoácidos puede reemplazarse por una hilera estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de miembros de la familia de cadenas laterales.

25 En la siguiente tabla se proporcionan ejemplos no limitativos de sustituciones conservativas de aminoácidos, donde una puntuación de similitud de 0 o superior indica una sustitución conservativa entre los dos aminoácidos.

30

35

Tabla A. Matriz de similitud de aminoácidos

		C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
5	W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
	Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	1 0	
	F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
	L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
	I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
10	M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
	V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
	R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
	K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
	H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
15	Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
	N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
	E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
	D	-5	1	-1	0	0	0	4													
	T	-2	0	0	1	1	3														
20	A	-2	1	1	1	2															
	S	0	1	1	1																
	P	-3	-1	6																	
	G	-3	5																		
	C	1 2																			
25																					

Tabla B. Sustituciones de Aminoácidos Conservativas

	Para sustitución de aminoácido	con
30	Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
	Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
	Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
	Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
35	Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser

	Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
	Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
5	Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
	Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
	Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
	Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
10	Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
	Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
	Prolina	D-Pro
	Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
15	Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
	Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
	Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos descritos en el presente documento pueden modificarse de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión que se produce de manera natural del que derivan. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de aminoácidos derivados de una proteína designada puede ser similar, por ejemplo, tener un cierto porcentaje de identidad con la secuencia inicial, por ejemplo, puede ser el 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia inicial.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CCR8 son mAb modificados que comprenden una región constante de cadena pesada modificada, como una cadena pesada afucosilada, que se une con mayor afinidad al receptor Fc γ activador que media la ADCC mejorada en comparación con un mAb no modificado. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CCR8 comprenden una cadena pesada que es una variante de IgG1 humana que incluye la única o combinación de L234Y, L235Q, G236W, S239D/M, F243L, H268D, D270E, R292P, S298A, Y300L, V305I, K326D, A330L/M, I332E, K334A/E, P396L que mejoran la función ADCC (toda la numeración de la UE).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de uno o más restos normalmente no asociados con un anticuerpo. Las

modificaciones a modo de ejemplo se describen con más detalle a continuación. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una secuencia conectora flexible, o puede modificarse para agregar un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o un marcador).

5 Los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos de la descripción incluyen derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una al epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos pueden ser modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un
10 ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

15 ***Conjugados anticuerpo-fármaco***

Se sobreexpresa GPRC5D en ciertas células hematológicas malignas, tales como las células de mieloma múltiple. Los anticuerpos y fragmentos de la presente descripción, por lo tanto, se pueden usar para dirigir esas células malignas para inhibición, inactivación de destrucción. En un ejemplo, el fragmento de anticuerpo se conjuga con un agente que ayuda a
20 inhibir, inactivar o destruir la célula maligna. Se muestra en el presente documento que los anticuerpos pueden inducir endocitosis mediada por GPRC5D.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG. En algunas realizaciones, el agente
25 conjugado puede ser un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un modulador innato, como un agonista de STimulator de Interferon Genes (STING), o un agonista de TLR7/8.

En una realización, los experimentos o fragmentos de la divulgación se unen covalentemente a un resto de fármaco. El resto de fármaco puede ser, o modificarse para incluir, un grupo reactivo con un punto de conjugación en el anticuerpo. Por ejemplo, un resto
30 de fármaco se puede unir por alquilación (por ejemplo, en el grupo épsilon-amino de lisinas o en el extremo N-terminal de anticuerpos), aminación reductora de carbohidratos oxidados, transesterificación entre grupos hidroxilo y carboxilo, amidación en grupos amino o grupos carboxilo, y conjugación a tioles.

En algunas realizaciones, el número de fracciones de fármaco, p, conjugadas por
35 molécula de anticuerpo varía en promedio de 1 a 8; 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2. En

algunas realizaciones, p oscila entre una media de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, p es un promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. En algunas realizaciones, p oscila desde un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 9, aproximadamente 1 a aproximadamente 8, aproximadamente 1 a aproximadamente 7, aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p oscila desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8, aproximadamente 2 a aproximadamente 7, aproximadamente 2 a aproximadamente 6, aproximadamente 2 a aproximadamente 5, aproximadamente 2 a aproximadamente 4 o aproximadamente 2 a aproximadamente 3.

Por ejemplo, cuando la activación química de la proteína da como resultado la formación de grupos tiol libres, la proteína puede conjugarse con un agente reactivo de sulfhidrilo. En un aspecto, el agente es uno que es sustancialmente específico para los grupos tiol libres. Tales agentes incluyen, por ejemplo, maleamida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometilcetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yoduro, bromuro o cloruro), vinilsulfona y piridiltio.

El fármaco se puede unir al anticuerpo o fragmento mediante un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un conector escindible es típicamente susceptible de escisión en condiciones intracelulares. Los conectores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible mediante una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosomal o una proteasa endosomal. En realizaciones a modo de ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como valina-citrulina (val-cit), un enlazador de fenilalanina-lisina (phe-lys), o enlazador maleimidocaprónico-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (mc-Val-Cit-PABA). Otro enlazador es Sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (smcc). La conjugación sulfo-smcc se produce a través de un grupo maleimida que se hace reaccionar con los sulfhidrilos (tioles, -SH), mientras que su éster sulfo-NHS se hace reaccionar con las aminas primarias (como se encuentra en la lisina y la proteína o el péptido N-terminal). Aún otro enlazador es maleimidocaproilo (mc). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH específico o un intervalo de pH, como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores disulfuro. El enlazador puede unirse covalentemente al anticuerpo hasta tal punto que el anticuerpo debe degradarse intracelularmente para que el fármaco se libere, por ejemplo, el enlazador mc y similares.

Un conector puede incluir un grupo para el enlace con el anticuerpo. Por ejemplo, el enlazador puede incluir grupos reactivos amino, hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo (por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometilcetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yoduro, bromuro o cloruro), vinilsulfona y piridiltio).

En algunas realizaciones, el resto de fármaco es un agente citotóxico o citostático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, una toxina o similares. El conjugado se puede usar para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o cancerosa, provocar la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Por consiguiente, el conjugado se puede usar en una variedad de escenarios para el tratamiento de cánceres animales. El conjugado se puede usar para administrar un fármaco a una célula tumoral o a una célula cancerosa. Sin estar unido a la teoría, en algunas realizaciones, el conjugado se une a o se asocia con una célula cancerosa que expresa GPRC5D, y el conjugado y/o el fármaco puede incorporarse dentro de una célula tumoral o una célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptor.

Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas dentro del conjugado (por ejemplo, en un enlazador) se escinden hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a células tumorales o cancerosas, lo que da como resultado la liberación del fármaco. El fármaco liberado queda entonces libre para migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas u otras. En algunas realizaciones, el fármaco se escinde del anticuerpo fuera de la célula tumoral o de la célula cancerosa, y el fármaco penetra posteriormente en la célula o actúa en la superficie celular.

Ejemplos de cargas o restos de fármacos se seleccionan del grupo que consiste en DM1 (maitansina, N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)- o N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimidocaproil-monometilauristatin-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(2-tiazolil)etil]amino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-(9CI)-L-valinamida), mc-MMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoil-(αR, βR,2S)-β-metoxi-α-metil-2-pirrolidinapropanoil-L-fenilalanina) y mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimidocaproil-ValcCit-(p-aminobenciloxicarbonil)-monometilauristatina E o N-[[[4-[[N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-L-valil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil]amino]fenil]metoxi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletal]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]-1-pirrolidinil]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida). DM1 es un

derivado del inhibidor de tubulina maitansina mientras que MMAD, MMAE, y MMAF son derivados de auristatina. En algunas realizaciones, el resto de fármaco se selecciona del grupo que consiste en mc-MMAF y mc-Val-Cit-PABA-MMAE. En algunas realizaciones, el resto del fármaco es un maitansinoide o una auristatina.

5 Los anticuerpos o fragmentos pueden conjugarse o fusionarse con un agente terapéutico, que puede incluir etiquetas detectables tales como etiquetas radiactivas, un inmunomodulador, una hormona, una enzima, un oligonucleótido, un agente terapéutico o de diagnóstico fotoactivo, un agente citotóxico, que puede ser un fármaco o una toxina, un agente potenciador de ultrasonidos, un marcador no radiactivo, una combinación de los mismos y
10 otros agentes conocidos en la técnica.

Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable acoplándolos a un compuesto quimioluminiscente. A continuación, se determina la presencia del polipéptido de unión a antígeno marcado con quimioluminiscencia detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje
15 quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal acridinio y éster de oxalato.

Los anticuerpos también se pueden marcar de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las técnicas para conjugar varios restos a un anticuerpo se conocen bien, véase, *por ejemplo*, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson
20 *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic
25 Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Moléculas Bi-funcionales y Terapias de Combinación

Se sobreexpresa GPRC5D en ciertas células hematológicas malignas, tales como las células de mieloma múltiple. Los anticuerpos y fragmentos de la presente descripción, por lo
35 tanto, se pueden usar para dirigir esas células malignas para inhibición, inactivación de

destrucción. En algunas realizaciones, se proporciona una molécula/anticuerpo bifuncional o biespecífico que se dirige tanto a la proteína GPRC5D como a una célula inmunitaria.

En algunas realizaciones, la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, un neutrófilo, una célula dendrítica, un fagocito, una célula asesina natural, un eosinófilo, un basófilo y un mastocito. Las moléculas de la célula inmunitaria a las que se puede dirigir incluyen, por ejemplo, CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 y 4-1BB (también conocido como CD137). Otros ejemplos incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3 (también conocido como CD223), CD28, CD122, TIM3, OX-40 o OX40L, CD40 o CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM o BTLA (también conocido como CD272), receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR) y CD47. Los ejemplos específicos de biespecificidad incluyen, sin limitación, GPRC5D/CD3.

También se proporcionan diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos. En algunas realizaciones, cada uno de los fragmentos anti-PD-L1 y el segundo fragmento se selecciona cada uno independientemente de un fragmento Fab, un fragmento variable monocaténario (scFv) o un anticuerpo monodominio. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico incluye además un fragmento Fc.

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos y métodos para preparar los anticuerpos

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados o moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos de la divulgación. Los polinucleótidos de la presente descripción pueden codificar las regiones variables de cadena pesada y ligera completas de los polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótido separadas. Además, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar porciones de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula polinucleotídica o en moléculas polinucleotídicas separadas.

Los métodos para producir anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen en el presente documento. En determinadas realizaciones, tanto la región variable como la constante de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación son completamente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos pueden fabricarse usando técnicas descritas en la técnica y como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos totalmente humanos contra un antígeno específico administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir

dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos han sido inhabilitados. Las técnicas a modo de ejemplo que se pueden usar para producir tales anticuerpos se describen en las patentes de EE. UU.: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140 que se incorporan como referencia en su totalidad.

5 ***Métodos de Tratamiento***

Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos, variantes o derivados de la presente descripción pueden usarse en ciertos métodos de tratamiento y diagnóstico.

La presente divulgación se refiere además a terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de los anticuerpos de la divulgación a un paciente, como un animal, un mamífero y un ser humano, para tratar uno o más de los trastornos o afecciones descritos en el presente documento. Los compuestos terapéuticos de la divulgación incluyen, entre otros, anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de los mismos como se describe en el presente) y ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de los mismos como se describe en el presente).

Los anticuerpos de la divulgación también se pueden usar para tratar o inhibir el cáncer. Tal como se proporcionó anteriormente, GPRC5D puede sobreexpresarse en células cancerosas, en particular mieloma múltiple. Se ha demostrado que la inhibición de GPRC5D es útil para tratar los cánceres.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita. El método, en una realización, implica administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente divulgación. En algunas realizaciones, al menos una de las células cancerosas del paciente sobreexpresa GPRC5D. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo o es competente para ADCC. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo comprende además un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es biespecífico y se dirige además a una célula inmunitaria, tal como una célula T citotóxica.

Las terapias celulares, tales como las terapias de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) (o células NK, macrófagos), también se proporcionan en la presente divulgación. Se puede usar una célula adecuada, que se pone en contacto con un anticuerpo anti-GPRC5D de la presente divulgación (o alternativamente modificada para expresar un anticuerpo anti-GPRC5D de la presente divulgación). Tras tal contacto o ingeniería, la célula puede entonces ser introducida a un paciente con cáncer que necesite un tratamiento. El paciente con cáncer puede tener un cáncer de cualquiera de los tipos descritos en el presente documento. La célula (por ejemplo, célula T) puede ser, por ejemplo, un linfocito T infiltrante

de tumor, una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula asesina natural (NK), un macrófago o la combinación de los mismos, sin limitación.

5 En algunas realizaciones, la célula se aisló del propio paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la célula se proporcionó por un donante o de un banco de células. Cuando la célula se aísla del paciente con cáncer, se pueden minimizar las reacciones inmunitarias no deseadas.

10 Los ejemplos no limitativos de cánceres incluyen cánceres hematológicos tales como mieloma múltiple. Otros ejemplos incluyen leucemia (incluidas las leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo las mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), y linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), y mieloma múltiple.

15 Un régimen de dosificación y tratamiento específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluidos los anticuerpos particulares, la variante o derivado de los mismos utilizados, la edad del paciente, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. El juicio de tales factores por parte de los cuidadores médicos está dentro de la experiencia ordinaria en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual a tratar, la vía de
20 administración, el tipo de formulación, las características del compuesto utilizado, la gravedad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad usada se puede determinar mediante principios farmacológicos y farmacocinéticos bien conocidos en la técnica.

25 Los métodos de administración de los anticuerpos, variantes o incluyen pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los polipéptidos o composiciones de unión a antígeno pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que contienen los
30 polipéptidos de unión a antígeno de la descripción pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisterna, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal, oral o nasal. rociar.

35 El término "parenteral", tal como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración que incluyen inyección y perfusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos de la divulgación en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante.

Puede ser deseable administrar los polipéptidos de unión a antígeno o las composiciones de la divulgación localmente en el área que necesita el tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no de forma limitada, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunción, con un apósito para heridas después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, incluyendo un anticuerpo, según la divulgación, se debe tener cuidado de usar materiales en los que la proteína no se absorba.

La cantidad de los anticuerpos de la divulgación que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria, inmune o maligna puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad, trastorno o estado, y deberá decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de prueba de modelos con animales o *in vitro*.

Como proposición general, la dosis administrada a un paciente de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación es típicamente de 0.1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente, entre 0.1 mg/kg y 20 mg/kg de la peso corporal del paciente, o 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos exógenos. Por lo tanto, a menudo son posibles dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosis y la frecuencia de administración de anticuerpos de la descripción pueden reducirse mejorando la absorción y penetración tisular (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una realización adicional, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con citocinas. Las citocinas que se pueden administrar con las composiciones de la descripción incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, anti-CD40, CD40L, y TNF- α .

5 En realizaciones adicionales, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con otros regímenes terapéuticos o profilácticos, tal como, por ejemplo, radioterapia.

Métodos de diagnóstico

10 Se observa la sobreexpresión de GPRC5D en ciertas muestras de tumores, y los pacientes que tienen células que sobreexpresan GPRC5D probablemente respondan a los tratamientos con los anticuerpos anti-GPRC5D de la presente divulgación. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden usar con fines de diagnóstico y pronóstico.

15 Se puede obtener una muestra que incluye preferentemente una célula de un paciente, que puede ser un paciente con cáncer o un paciente que desea un diagnóstico. La célula puede ser una célula de un tejido tumoral o un bloque tumoral, una muestra de sangre, una muestra de orina o cualquier muestra del paciente. Tras el pretratamiento opcional de la muestra, la muestra se puede incubar con un anticuerpo de la presente descripción en condiciones que permitan que el anticuerpo interactúe con una proteína GPRC5D
20 potencialmente presente en la muestra. Se pueden utilizar métodos como ELISA, aprovechando el anticuerpo anti-GPRC5D, para detectar la presencia de la proteína GPRC5D en la muestra.

La presencia de la proteína GPRC5D en la muestra (opcionalmente con la cantidad o concentración) puede utilizarse para el diagnóstico de cáncer, como indicación de que el
25 paciente es apto para un tratamiento con el anticuerpo, o como indicación de que el paciente tiene (o tiene no) respondió a un tratamiento contra el cáncer. Para un método de pronóstico, la detección se puede realizar de una, dos o más veces, en determinadas etapas, al inicio de un tratamiento contra el cáncer para indicar el progreso del tratamiento.

Composiciones

30 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo, y un portador aceptable. En algunas realizaciones, la composición incluye además un segundo agente anticancerígeno (por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario).

35 En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la

Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente, en seres humanos. Además, un "portador farmacéuticamente aceptable" será generalmente una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo no tóxico.

5 El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de derivados de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de
10 sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosa como portadores líquidos, particularmente para las soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua,
15 etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH tales como acetatos, citratos o fosfatos. Agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; También se prevén agentes para el
20 ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de
25 manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin, incorporado en el presente documento como referencia. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de unión a antígeno, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad
30 adecuada de portador para proporcionar la forma adecuada para la administración al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración. La preparación parental puede delimitarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechas de vidrio o plástico.

35 En una realización, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a

seres humanos. Habitualmente, las composiciones para la administración intravenosa son disoluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como la lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran separadamente o mezclados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o sachet en el que se indique la cantidad de agente activos. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se va a administrar por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o de solución salina de modo que se puedan mezclar los ingredientes antes de la administración.

Los compuestos de la divulgación pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como los procedentes de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes, tales como los derivados de los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales murinos contra GPRC5D humana

La proteína GPRC5D humana se usó para inmunizar diferentes cepas de ratones y, por consiguiente, se generaron hibridomas. Se recogieron más de veinte clones de hibridoma para su posterior análisis.

Se sometió a prueba la unión de los anticuerpos recogidos de los sobrenadantes de los hibridomas a la proteína GPRC5D humana expresada en células CHO K1. Las células CHO-K1 expresaron establemente GPRC5D humana, se recogieron de matraces. Se incubaron 100 μ l de 1×10^6 células/ml de células con anticuerpos murinos en diluciones en serie de 3 veces durante 30 minutos en hielo. Después de lavar dos veces con 200 μ l de tampón de FACS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células dos veces con 200 μ l de tampón FACS y se transfirieron a un tubo BD Falcon de 5 ml y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos murinos pueden unirse a GPRC5D humana con EC50 alta (**Figura 1**). Los resultados se muestran en la tabla a continuación. Todos ellos presentaron una buena actividad de unión.

	Parte	Parte	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
--	-------	-------	---------	-----------	------	-------------

		inferior	superior				
	2D3C12	46110	835137	0.4535	1.132	2.841	789027
5	6G10D9	6870	1429638	0.9116	0.9535	8.159	1422768
	11C1H10	40235	859162	0.5274	1.101	3.368	818927
	14C2A11C6	5573	728662	0.9934	0.8801	9.849	723089
	14C2F7C6	15616	751279	0.9634	0.9615	9.193	735663
	14F3H2	20428	872785	0.8744	1.146	7.489	852357
10	21C3C11B3	57013	1508205	0.6538	1.1	4.506	1451192
	26E1D12	52742	677713	0.2246	1.303	1.677	624970
	29A7H11B9D3	71394	1385928	0.4219	1.259	2.642	1314534
	29A7H11H4C12	43439	1461931	0.7377	1.109	5.466	1418492
	29B2C10	68634	1607305	0.6201	1.305	4.17	1538671
15	31H11C10H7	16791	961550	0.9534	1.134	8.983	944759
	34D3F8B5	-16109	1407656	1.084	0.7475	12.12	1423765
	34D3H1	-13314	1412131	0.8843	0.8042	7.662	1425446
	34D4A10	2737	921851	1.019	0.8496	10.44	919114
	36F11E9H3	13852	766682	0.8732	1.087	7.468	752830
20	37B9C4	10880	1758861	0.5917	0.9933	3.906	1747981
	38A10E9A11	24016	1785041	0.9472	1.099	8.854	1761025
	39D2B6	7833	1774093	0.5469	0.98	3.523	1766260
	40A5B2	25394	1196144	0.5108	0.9236	3.242	1170750
	57G11D4A10	-22363	2089505	0.9703	0.8141	9.34	2111868
25	58F9G10	-14744	2052463	0.9635	0.8313	9.194	2067207

Se subclonaron 14 hibridomas y se determinaron las secuencias VH/VL (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia VH/VL de los anticuerpos murinos principales

	Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)	SEQ ID NO:
30	6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYTMH</u> WV KQRPQGQGLEWLG <u>YINPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>LRSRGYFDY</u> WGQGTT LTVSS	1
35	6G10D9 VL	DIVMTQSQTTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQ	2

		KTGQSPRLLIY <u>SASNRYT</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYT</u> FGGGTKLEIK	
5	21C3C11B3 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFIN <u>NYLIEWIKQ</u> RPGQGLEWIG <u>MINPGSGGTNYNEKFKD</u> KATLTADKSSS TAYMQLSSLTSDDSAVYFCARN <u>NWDV</u> WGQGTTTLTVSS	3
	21C3C11B3 VL	DVVMTQSPLSLPVS LGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTGNTYL</u> <u>H</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLG VYFC <u>SQSTHVPWT</u> FGGGTKLEIK	4
10	29B2C10 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKLSCKASGYSFT <u>GYTMHWW</u> KQSHGENLEWIG <u>LINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSS STAYMELLSLTSEDSAVYYCSR <u>WGLRRAMDY</u> WGQGTS VTVSS	5
15	29B2C10 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGSNVAWYQ</u> QKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> GVPDRFTGNGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFC <u>QQYYNSPWT</u> FGGGTKLEIK	6
20	34D3H1 VH	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS <u>SYGMS</u> WVR QTPDKRLEWVAT <u>ISSGGSYTYYPDSVKGR</u> RFTISRDNANK TLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR <u>QGGDAMDY</u> WGQGTSVT VSS	7
	34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC <u>RASQSINNNLH</u> WYQQK SHESPRLLIKY <u>ASQSIG</u> IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVET EDFGMYFC <u>QQSNSRLT</u> FGAGTKLELK	8
25	37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQP GGSMKLSCVASGFTFS <u>DYWMN</u> WV RQSPEKGLEWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESVKGR</u> RFTISRDD SKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTR <u>PLLWFRRYYAMDY</u> W GQGTSVTVSS	9
30	37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITISC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKP DGTVKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEP ADIATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
35	38A10E9A11 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYTMHWW</u> KQRPQG LEWIGY <u>INPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>LRSRGYFDY</u> WGRGTT LTVSS	11

5	38A10E9A11 VL	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITC KASQNVGTAVAWYQQ KPGQSPKLLIY SASNRYT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLAGYFC QQYSSYPYT FGGGTKLEIK	12
	40A5B2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT RNIMH WVK QKPGQGLEWIG YINPYNAGSKYNEKFKG KATLTSDISS TAYMELSSLTSEDSAVYYCARE EEVYYRYGAWFAY WGH GTLVTVSA	13
10	40A5B2 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASQSVSTSSYSYMH W YQQKPGQPPLIK YASNLES GVPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDTATYYC QHSWEIPRT FGGGTKLEIK	14
15	58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFT GYI HWVKQ SHGKSLEWIG YISCYNGATSFNQKFKG KATFTVDTSSST AYMQFNLSLTSEDSAVYYCAR TEL RGPF AY WGQGTLV TVSA	15
	58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCS SASSSVSYMN WYQQK SGTSPKRWIY DTSKLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYC QQWSNNPLT FGAGTKLELK	16
20	2D3C12 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCCKASGYAFIN YLIE WIKQ RPGQGLEWIG MINPGSGGTNYNEKFKD KATLTADKSS TAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR NWDV WGQGTTLTVSS	17
25	2D3C12 VL	DVVMTQSPLSLPVS LGDQASVSC RSSQSLVHSTGNTYL H WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLG VYFC SQSTHVPWT FGGGTKLEIK	18
	14C2A11C6 VH	QVHLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT TYTMH WV KQRPQGLEWIG YINPNSAYTNYNQKFKD KATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR RVLLLRVLDFFDY WGQ GTTLTVSS	19
30	14C2A11C6 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSINKYLT WYQEK GKTNKLLIY SGSTLQS GIPSRFSGSGSGSDFTLTISSLEPE DFAMYYC QQHNEYPLT FGTGTKLELK	20
35	14F3H2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT GYTMN WVK QSHGKNLEWIG LINPYNGGIRYNQKFKG KATLTVDKSSS TAYMELLSLTSEDSAVYYCAR WGLRRAMDY WGQGTSV	21

		TVSS	
5	14F3H2 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVGTNVA WYQ QKPGQSPKALIY SASYRYS GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFC QQYNSSPWT FGGGTKLEIK	22
	26E1D12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT GYTMN WVK QSHGKNLEWIG LINPYNGGTNYNQKFKG KATLAVDKSS STAYMDLLSLTSEDSAVYYCSR WGLRRAMDY WGQGTS VTVSS	23
10	26E1D12 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVGSNVA WYQ QKPGQSPKALIY SASYRYS GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFC QQYNNSPWT FGGGTKLEIK	24
15	29A7H11H4C12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT GYTMH WVK QSHGENLEWIG LINPYNGGTNYNQKFKG KATLTVDKSSS TAYMELLSLTSEDSAVYYCSR WGLRRAMDY WGQGTSTV TVSS	25
	29A7H11H4C12 VL	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC KASQNVGSNVA WYQQ KPGQSPKALIY SASYRYS GVPDRFTGNGSGTDFTLTISN VQSEDLAEYFC QQYYNSPWT FGGGTKLEIK	26
20	34D4A10 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFI SYLIE WIKQ RPGQGLEWIG MINPGSGGTNYNEKFKD KATLTADKSSS TAYMQLSSLTSDDSAVYFCARN NWDV WGQGTTTLTVSS	27
25	34D4A10 VL	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASVSC RSSQSLVHSTGNTYL H WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLG VYFC SQSTHVPWT FGGGTKLEIK	28

Ejemplo 2. Unión de anticuerpos quiméricos a GPRC5D

Se produjeron sintéticamente los genes VH y VK murinos y luego se clonaron respectivamente en vectores que contenían los dominios constantes gamma 1 humano y kappa humano. Se produjeron los anticuerpos quiméricos purificados a partir de células CHO transfectadas.

Las células CHO-K1 expresaron establemente GPRC5D humana, se recogieron de matraces. Se incubaron 100 µl de 1×10^6 células/ml de células con anticuerpos quiméricos primarios en diluciones en serie de 3 veces desde 300 nM hasta 0.001 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavar dos veces con 200 µl de tampón de FACS, las células se

incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células dos veces con 200 µl de tampón FACS y se transfirieron a un tubo BD Falcon de 5 ml y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos quiméricos pueden unirse a GPRC5D humana con EC50 alto (**Figura 2**).

5

Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

10

15

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
58F9G10	-521.8	414579	0.3596	0.8258	2.289	415101
40A5B2	1487	440269	0.3436	0.8189	2.206	438781
38A9E10A1 1	3016	386984	0.2453	1.037	1.759	383968
37B9C4	2078	405062	0.249	1.045	1.774	402985
34D3H1	3448	507844	0.5214	1.012	3.322	504396
29B2C10	4326	430443	0.342	1.041	2.198	426116
21C3C11B3	5774	403938	0.2293	1.286	1.696	398164
6G10D9	6886	458124	0.1012	1.343	1.262	451238

Ejemplo 3. EC50 de internalización de anticuerpos quiméricos GPRC5D en células CHO-GPRC5D

20

25

30

Los colorantes pHAb son colorantes sensores de pH que tienen una fluorescencia muy baja a pH > 7 y un aumento espectacular de la fluorescencia a medida que el pH de la solución se vuelve ácido. Los colorantes pHAb tienen un máximo de excitación (Ex) a 532 nm y un máximo de emisión (Em) a 560 nm. Los anticuerpos conjugados con colorante pHAb se pueden usar para controlar la internalización de anticuerpos mediada por receptores. Cuando un conjugado de colorante de anticuerpo-pHAb se une a su receptor en la membrana celular, muestra una fluorescencia mínima. Sin embargo, tras la internalización mediada por el receptor, los conjugados anticuerpo-colorante pHAb circulan hacia el endosoma y las vesículas lisosomales donde el pH es ácido, lo que hace que el colorante pHAb emita fluorescencia. Esta fluorescencia se puede detectar mediante diversas técnicas, entre las que se incluyen imágenes celulares, citometría de flujo y lectores basados en placas fluorescentes con los filtros adecuados.

35

Las células CHO GPRC5D humanas transfectadas de forma estable se recolectaron con tripsina/EDTA al 0.05 % (Gibco, 25300-054) y se sembraron en una placa negra de 96 pocillos (Thermo Scientific n.º 165305) a una densidad de 10 K por 90 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 20 a 24 h antes del tratamiento con anticuerpos marcados con pHAb.

Para la internalización, se añadieron anticuerpos GPRC5D quiméricos conjugados con pHAb a las células a diferentes niveles y se mezclaron suavemente durante 1–2 min en un mezclador de placas y luego se incubaron durante la noche para permitir la internalización (la internalización se puede detectar en unas pocas horas). Se leyeron las placas en un lector de placas fluorescentes en Ex/Em: 532 nm/560 nm en un instrumento Tecan Infinity M1000 Pro. Para lograr una mayor sensibilidad, se reemplazaron los medios por PBS antes de leer la placa.

Los resultados normalizados con DAR se muestran en la **Figura 3**. Tal como se muestra en la **Figura 3**, los anticuerpos quiméricos probados tienen una potente actividad de internalización.

Ejemplo 4. Prueba de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC)

El bioensayo Indicador de ADCC usa una lectura alternativa en un punto anterior de la activación de la vía ADCC MOA: la activación de la transcripción génica a través de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) en la célula efectora. Además, el bioensayo Indicador de ADCC usa células Jurkat modificadas por ingeniería que expresan de manera estable el receptor FcγRIIIa, variante V158 (alta afinidad) y un elemento de respuesta NFAT que conduce la expresión de luciferasa de luciérnaga como células efectoras. Se cuantifica la actividad biológica de anticuerpos en ADCC MOA a través de la luciferasa producida como resultado de la activación de la vía NFAT; la actividad de luciferasa en la célula efectora se cuantifica con lectura de luminiscencia. La señal es alta, el fondo del ensayo es bajo.

Se incubaron diluciones en serie del anticuerpo monoclonal quimérico GPRC5D durante 6 horas de inducción a 37°C con células efectoras Jurkat diseñadas (ADCC Bioassay Effector Cells), con o sin ADCC Bioassay Target Cells (GPRC5D). La actividad de luciferasa se cuantificó utilizando el reactivo Bio-Glo™ (en la **Figura 4**). Todos los anticuerpos probados exhibieron una potente capacidad para inducir ADCC.

Ejemplo 5. Humanización de los mAb del ratón

Se emplearon los genes de la región variable del anticuerpo murino para crear mAbs humanizados. En la primera etapa de este proceso, las secuencias de aminoácidos de VH y VL de mAb se compararon con la base de datos disponible de secuencias de genes de Ig humana para encontrar las secuencias de genes de Ig de línea germinal humana que mejor coincidían.

Las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado se proporcionan a continuación.

Secuencias humanizadas

A. 34D3H1

Tabla 2A. Humanización de 34D3H1 – VH

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
34D3H1 VH	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSS SYGMS WVR QTPDKRLEWVAT TISSGGSYTYYPDSVKGR RFTISRDNACKN TLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR QGGDAMDY WGQGTSVT VSS	7
V1 (injerto CDR)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS SYGMS WVR QAPGKGLEWVST TISSGGSYTYYPDSVKGR RFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGGDAMDY WGQGTLVT VSS	35
V2 (con mutaciones posteriores)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS SYGMS WVR QTP GKGLEWVA T ISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNACKN SLYLQM S SLRAEDTAVYYCAR QGGDAMDY WGQGTLVT VSS	36
V3 (con mutaciones posteriores)	EV H LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS SYGMS WVR QTP GK R LEWVA T ISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNACKN SL N LQM S SLRAEDTAVYYCAR QGGDAMDY WGQGTLVT VSS	37

Tabla 2B. Secuencias de CDR

CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGMS	29
CDR-H2	TISSGGSYTYYPDSVKG	30
CDR-H3	QGGDAMDY	31

Tabla 2C. Humanización de 34D3H1 – VL

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC RASQSINNNLH WYQQK SHESPRLLIK YASQ SIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVET EDFGMYFC QQSNSRLT FGAGTKLELK	8
V1 (injerto CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQSINNNLH WYQQK PGKAPKLLIY YASQ SIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC QQSNSRLT FGGGTKVEIK	38

5	V2 (con mutaciones posteriores)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNNLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>S</u> VQPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTKVEIK	39
	V3 (con mutaciones posteriores)	DIQ <u>L</u> TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNNLHWYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>S</u> VQPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTK <u>L</u> EIK	40
	V4 (con mutaciones posteriores)	DI <u>V</u> <u>L</u> TQSPSSLS <u>V</u> SVGDRVT <u>L</u> TCRASQSINNNLHWYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLTIS <u>S</u> VQPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTK <u>L</u> EIK	41

Tabla 2D. Secuencias de CDR

	CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
15	CDR-L1	RASQSINNNLH	32
	CDR-L2	YASQSIG	33
	CDR-L3	QQSNSRLT	34

Tabla 2E. Anticuerpos humanizados

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4
20	VH	34-XI			
	VH v1		34-H1L1	34-H1L2	34-H1L3
	VH v2		34-H2L1	34-H2L2	34-H2L3
	VH v3		34-H3L1	34-H3L2	34-H3L3
					34-H3L4

B. 37B9C4

Tabla 3A. Humanización de 37B9C4 – VH

	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
30	37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFS <u>DYWMN</u> WV RQSPEKGLEWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESVKGR</u> RFTISRDD SKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTR <u>PLLWFRRYYAMDY</u> W GQGTSVTVSS	9
	V1 (injerto CDR)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>DYWMN</u> WV RQAPGKGLEWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESVKGR</u> RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PLLWFRRYYAMDY</u> W	48

	GQGT ~~L~~ TVTVSS	
5	V2 (con mutaciones posteriores) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWV RQ <u>S</u> PGKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDN AK <u>S</u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>T</u> RPLLWFRRYYAMDYW GQGT ~~L~~ TVTVSS	49
10	V3 (con mutaciones posteriores) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWV RQ <u>S</u> PGKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISR <u>D</u> <u>S</u> K <u>S</u> <u>S</u> VYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>T</u> RPLLWFRRYYAMDYW GQGT ~~L~~ TVTVSS	50

Tabla 3B. Secuencias de CDR

	CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
	CDR-H1	DYWMN	42
15	CDR-H2	EIRLKSNNYATHYAESVKG	43
	CDR-H3	PLLWFRRYYAMDY	44

Tabla 3C. Humanización de 37B9C4 – VL

	Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
20	37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITISC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKP DGTVKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEP ADIATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
25	V1 (injerto CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQK PGKAPKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGQGTKLEIK	51
	V2 (con mutaciones posteriores)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQK PGK <u>TV</u> KLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSLQ PEDFATYYCQQYSKLPFTFGQGTKLEIK	52
30	V3 (con mutaciones posteriores)	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCSASQGISNYLNWYQQKP GK <u>TV</u> KLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSLQP EDFATYYCQQYSKLPFTFG <u>S</u> GTKLEIK	53

Tabla 3D. Secuencias de CDR

	CDR	Secuencia	SEQ ID
--	------------	------------------	---------------

5

		NO:
CDR-L1	SASQGISNYLN	45
CDR-L2	YTSSLHS	46
CDR-L3	QQYSKLPFT	47

Tabla 3E. Anticuerpos humanizados

10

	VL	VL v1	VL v2	VL v3
VH	37B9C4-XI			
VH v1		37-H1L1	37-H1L2	37-H1L3
VH v2		37-H2L1	37-H2L2	37-H2L3
VH v3		37-H3L1	37-H3L2	37-H3L3

C. 58F9G10**Tabla 4A. Humanización de 58F9G10 – VH**

15

20

25

30

35

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFT GY YIHWVKQ SHGKSLEWIG YIS CYNGAT SF NQKF K GKATFTVDTSSST AYMQFNLSLTSEDSAVYYCAR TEL RGPWF FAY WGQGTLVT VSA	15
V1 (injerto CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYSFT GY YIHWVR QAPGQGLEWMG YISS YNAAT SF NQKF K GGRVTMTTRDTST STVYMESSLRSEDTAVYYCAR TEL RGPWF FAY WGQGTL VTVSS	61
V2 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYSFTGYIHWVR QAPGQGLEW I GYISS Y NAAT SF NQKF K GGRVT F T V DTSTS TVYMESSLRSEDTAVYYCAR TEL RGPWF FAY WGQGTLV TVSS	62
V3 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYSFTGYIHWV K QAPGQGLEW I GYISS Y NAAT SF NQKF K GGRVT F T V DTSTS TVYME F SSLRSEDTAVYYCAR TEL RGPWF FAY WGQGTLV TVSS	63
V4 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEVKKPGASVK I SCCKASGYSFTGYIHWV K Q APGQGLEW I GYISS Y NAAT SF NQKF K GR A T F T V DTSTST A YME F SSLRSEDT S AVYYCAR TEL RGPWF FAY WGQGTLVT	64

	VSS	
--	-----	--

Tabla 4B. Secuencias de CDR

CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR-H1	GYYIH	54
CDR-H2	YISCYNGATSFNQKFKG YIS <u>S</u> YNA <u>A</u> TSFNQKFKG	60 55
CDR-H3	TELRGPWFAY	56

Tabla 4C. Humanización de 58F9G10 – VL

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS <u>SASSSVSYM</u> NWYQQK SGTSPKRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYC <u>QQWSNNPLT</u> FGAGTKLELK	16
V1 (injerto CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS <u>SASSSVSYM</u> NWYQQK PGKAPKLLIY <u>DTSKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QQWSNNPLT</u> FGQGGTKLEIK	65
V2 (con mutaciones posteriores)	D <u>I</u> QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQK PGKAPK <u>R</u> LIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSLQ PEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGGTKLEIK	66
V3 (con mutaciones posteriores)	D <u>T</u> <u>Q</u> <u>L</u> TQSPSSLSASVGDRVT <u>M</u> TCSASSSVSYMNWYQQ KPGKAPK <u>R</u> LIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISS <u>M</u> QPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGGTKLEIK	67

Tabla 4D. Secuencias de CDR

CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASSSVSYM	57
CDR-L2	DTSKLAS	58
CDR-L3	QQWSNNPLT	59

Tabla 3E. Anticuerpos humanizados

	VL	VL v1	VL v2	VL V3
VH	58F9G10-XI			

5

VH v1		58-H1L1	58-H1L2	58-H1L3
VH v2		58-H2L1	58-H2L2	58-H2L3
VH v3		58-H3L1	58-H3L2	58-H3L3
VH v4		58-H4L1	58-H4L2	58-H4L3

D. 6G10D9**Tabla 5A. Humanización de 6G10D9 – VH**

10

15

20

25

30

35

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT TYTMH WV KQRPGQGLEWL GYINPSSGYTNYNQKFKD KATLTAGKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS LR SRGYFDY WGQGTT LTVSS	1
V1 (injerto CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT TYTMH WVR QAPGQGLEWM GYINPSSGYTNYNQKFKD RVMTMRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCS R LR SRGYFDY WGQGTL VTVSS	74
V2 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYTMHWVR QAPGQGLEW L GYINPSSGYTNYNQKFKDRVTMT ADT ST STVYMELSSLRSEDTAVYYC A R L R SRGYFDY WGQGT L TVSS	75
V3 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEV A KPGASVKVSKASGYTFTTYTMHW V K QAPGQGLEW L GYINPSSGYTNYNQKFKDRVTMT ADT ST STVYMELSSLRSEDTAVYYC A S L R SRGYFDY WGQGT L TVSS	76
V4 (con mutaciones posteriores)	QVQLVQSGAEV A KPGASVK M SCKASGYTFTTYTMHWV K QAPGQGLEW L GYINPSSGYTNYNQKFKDRVT L TA DTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYC A S L R SRGYFDY WGQGT L L TVSS	77
V5 (con mutaciones posteriores)	QVQL Q QSGAEV A KPGASVK M SCKASGYTFTTYTMHWV K Q R PGQGLEW L GYINPSSGYTNYNQKFKDRVT L TA D K S TSTVYMELSSLRSEDTAVYYC A S L R SRGYFDY WGQGT L L TVSS	78
V6 (con	QVQL Q QSGAEV A KPGASVK M SCKASGYTFTTYTMHWV	79

mutaciones posteriores)	<u>KQR</u> PGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFCDRA <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> AGKS TSTVYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYC <u>AS</u> LRSGYFDYWGQGTL <u>L</u> TVSS	
----------------------------	--	--

Tabla 5B. Secuencias de CDR

CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
CDR-H1	TYTMH	D01
CDR-H2	YINPSSGYTNYNQKFKD	D02
CDR-H3	LRSGYFDY	D03

Tabla 5C. Humanización de 6G10D9 – VL

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQ KTGQSPRLLIY <u>SASNRYT</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYT</u> FGGGTKLEIK	2
V1 (injerto CDR)	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQK PGKAPKLLIY <u>SASNRYT</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QQYSSYPYT</u> FGQGTKLEIK	80
V2 (con mutaciones posteriores)	DIQLTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVITITCKASQNVGTAVVWYQQK PGK <u>S</u> PKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDFAT <u>E</u> YCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK	81
V3 (con mutaciones posteriores)	DIQ <u>M</u> TQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVITITCKASQNVGTAVVWYQQK PGK <u>S</u> PKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS <u>M</u> Q PEDFAT <u>F</u> FCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK	82
V4 (con mutaciones posteriores)	DI <u>V</u> MTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVITITCKASQNVGTAVVWYQQK PGK <u>S</u> PKLLIYSASNRYTGV <u>P</u> DRFSGSGSGTEFTLTIS <u>M</u> Q PEDFAT <u>F</u> FCQQYSSYPYTFG <u>G</u> GTKLEIK	83
V1a (injerto CDR versión a)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQ KPGQAPRLLIY <u>SASNRYT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYC <u>QQYSSYPYT</u> FGQGTKLEIK	84

5	V2a (con mutaciones posteriores)	EIVMTQSPATLSTSPGERATLSCKASQNVGTAVVWYQQ KPGQSPRLLIYSASNRYTGIPDRFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVFECQQYSSYPYTFGQGKLEIK	85
	V3a (con mutaciones posteriores)	EIVMTQSPATLSTSPGERVTISCKASQNVGTAVVWYQQK PGQSPRLLIYSASNRYTGIPDRFTGSGSGTDFTLTISMQ SEDFAVFECQQYSSYPYTFGGKLEIK	86

Tabla 5D. Secuencias de CDR

10	CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
	CDR-L1	<u>KASQNVGTAVV</u>	71
	CDR-L2	<u>SASNRYT</u>	72
	CDR-L3	<u>QQYSSYPYT</u>	73

Tabla 5E. Anticuerpos humanizados

15		VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4	VL v1a	VL v2a	VL v3a
	VH	6G10D9-XI							
	VH v1		6-H1L1	6-H1L2	6-H1L3				
	VH v2		6-H2L1	6-H2L2	6-H2L3				
	VH v3		6-H3L1	6-H3L2	6-H3L3				
	VH v4		6-H4L1	6-H4L2	6-H4L3				
	VH v5								
	VH v6								

Ejemplo 6. Prueba de Anticuerpos Humanizados

Este ejemplo sometió a prueba la capacidad de algunos de los anticuerpos humanizados para unirse a GPRC5D expresado en células CHO-K1.

De los anticuerpos humanizados derivados de 6G10D9, 6-H2L1 y 6-H3L3 superaron a los demás (**Figura 5, Tabla 6**).

Tabla 6. Actividades de anticuerpos humanizados de 6G10D9 para unirse a GPRC5D

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
6G10D9-XI	6858	121725	0.2992	1.525	1.991	114867
6-H1L1	192.6	~ 6397	~ 3.102	1.198	~ 1264	~ 6205
6-H1L2	191.9	898894	5.224	1.19	167639	898702
6-H1L3	226.2	16478302	5.389	1.156	244790	16478076
6-H2L1	189.1	661560	5.039	1.232	109294	661371
6-H2L2	192.5	1271084	5.37	1.191	234364	1270892
6-H2L3	215.7	10592380	5.039	1.23	109279	10592164
6-H3L1	-205.1	74293	2.352	0.8392	225.1	74498
6-H3L2	68.94	47463	2.244	0.9532	175.3	47394
6-H3L3	3994	119304	0.9553	1.13	9.022	115310
6-H4L1	61.5	50293	1.654	0.9277	45.05	50231
6-H4L2	9.56	39449	1.976	0.911	94.63	39440
6-H4L3	2344	126413	0.9049	1.052	8.033	124069

Tal como se muestra en la **Figura 6** y **Tabla 7**, todas las versiones humanizadas de 58F9G10 parecían tener un buen rendimiento.

Tabla 7. Actividades de anticuerpos humanizados de 58F9G10 para unirse a GPRC5D

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
58F9G10-XI	6697	127349	0.2925	1.292	1.961	120652
58-H1L1	15047	107881	0.2519	1.342	1.786	92834
58-H1L2	5500	114432	0.2632	1.238	1.833	108932
58-H1L3	4227	105346	0.2308	1.14	1.701	101119
58-H2L1	3617	109672	0.3776	1.064	2.386	106055
58-H2L2	4837	107888	0.3448	1.091	2.212	103050
58-H2L3	1229	91713	0.2697	0.9633	1.861	90483
58-H3L1	9887	103663	-0.1918	1.382	0.643	93776

5

58-H3L2	5981	105458	0.3742	1.195	2.367	99476
58-H3L3	4022	97718	0.3177	1.105	2.078	93695
58-H4L1	4993	104559	0.3655	1.179	2.32	99566
58-H4L2	4600	105051	0.3407	1.143	2.191	100451
58-H4L3	6249	102650	0.2874	1.27	1.938	96401

Asimismo, tal como se muestra en la **Figura 7** y **Tabla 8**, todas las versiones humanizadas de 34D3H1 parecieron tener un buen rendimiento, comparable al anticuerpo quimérico.

10

Tabla 8. Actividades de anticuerpos humanizados de 34D3H1 para unirse a GPRC5D

15

20

25

30

35

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
34-XI	16525	192054	0.4947	1.454	3.124	175530
34-H1L1	10921	196570	0.5908	1.314	3.898	185650
34-H1L2	13856	182030	0.5836	1.436	3.834	168174
34-H1L3	10620	185840	0.5732	1.167	3.743	175220
34-H1L4	10299	188925	0.5999	1.195	3.98	178626
34-H2L1	7854	187153	0.6188	1.173	4.157	179298
34-H2L2	8736	178873	0.6254	1.118	4.221	170137
34-H2L3	7063	185842	0.5832	1.11	3.83	178779
34-H2L4	4393	192405	0.6092	1.041	4.066	188012
34-H3L1	11139	178248	0.5207	1.228	3.317	167109
34-H3L2	9036	179809	0.6464	1.146	4.43	170773
34-	9118	192976	0.6508	1.1	4.475	183858

H3L3						
34-H3L4	12751	192533	0.5981	1.263	3.963	179782

Además, tal como se muestra en la **Figura 8** y **Tabla 9**, todas las versiones humanizadas de 37B9C4 parecían tener un buen rendimiento, comparable a la contraparte química.

Tabla 9. Actividades de anticuerpos humanizados de 37B9C4 para unirse a GPRC5D

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
37B9C4-XI	11711	188479	0.2364	1.502	1.723	176769
37-H1L1	9596	178413	0.3574	1.613	2.277	168817
37-H1L2	8848	181865	0.3502	1.534	2.24	173017
37-H1L3	10445	173229	0.2332	1.528	1.711	162784
37-H2L1	9184	175072	0.351	1.583	2.244	165888
37-H2L2	9383	175293	0.3455	1.656	2.216	165910
37-H2L3	8049	168032	0.3334	1.564	2.155	159982
37-H3L1	6372	179261	0.2921	1.35	1.96	172889
37-H3L2	9193	179304	0.3153	1.428	2.067	170111
37-H3L3	7780	181053	0.2846	1.305	1.926	173273

Basándose en los datos anteriores, se seleccionaron los anticuerpos humanizados 6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 y 37-H1L1 para realizar más pruebas de confirmación.

Ejemplo 7. Pruebas confirmativas de anticuerpos humanizados seleccionados

Este ejemplo sometió a prueba algunos de los anticuerpos humanizados (6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 y 37-H1L1) en cuanto a su capacidad para unirse a la proteína GPRC5D humana expresada en células CHO-K1 y NCI-H929.

Los datos de unión a CHO-K1 se representan en la **Figura 9** y se resumen en la **Tabla 10** a continuación.

Tabla 10. Unión a GPRC5D en células CHO-K1

	Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
6-XI	523.9	104077	0.4723	1.095	2.967	103553

5	58-XI	52.25	107000	0.5562	0.9481	3.599	106948
	6-H3L3	172	134045	1.412	0.8045	25.82	133873
	6-H4L3	109.4	145833	1.421	0.7392	26.34	145724
	58-H1L1	275.4	99454	0.579	0.972	3.793	99178
	58-H3L1	75.37	104402	0.612	0.9135	4.093	104326
10	34-XI	688.6	117714	0.5776	1.054	3.781	117025
	37-XI	792.6	113379	0.3877	1.175	2.442	112586
	34-H1L1	170.8	119038	0.781	0.8745	6.04	118867
	37-H1L1	523.2	102496	0.511	1.042	3.244	101973

Tabla 11. Unión a GPRC5D en células NCI-H929

15		Parte inferior	Parte superior	LogEC50	HillSlope	EC50	Envergadura
	6-XI	269.4	13785	0.05146	1.313	1.126	13515
	58-XI	261.4	14738	0.1596	1.269	1.444	14476
	6-H3L3	129.8	21859	1.465	0.8063	29.18	21730
	6-H4L3	80.05	28987	1.606	0.7142	40.33	28907
20	58-H1L1	281	13474	0.1648	1.319	1.462	13193
	58-H3L1	275.5	13934	0.3	1.297	1.995	13658
	34-XI	181.1	18146	0.7587	0.9911	5.738	17965
	34-H1L1	199.3	17911	0.8048	1.011	6.379	17712
25	37-XI	337.6	13807	-0.05621	1.41	0.8786	13470
	37-H1L1	341.8	13534	-0.1991	1.419	0.6323	13192

Estos datos, por lo tanto, confirman que estos anticuerpos humanizados seleccionados son adecuados para un mayor desarrollo clínico.

Ejemplo 8. ADCC de Anticuerpos Humanizados

El bioensayo Indicador de ADCC usa una lectura alternativa en un punto anterior de la activación de la vía ADCC MOA: la activación de la transcripción génica a través de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) en la célula efectora. Además, el bioensayo Indicador de ADCC usa células Jurkat modificadas por ingeniería que expresan de manera estable el receptor FcγRIIIa, variante V158 (alta afinidad) y un elemento de respuesta NFAT que conduce la expresión de luciferasa de luciérnaga como células efectoras. Se cuantifica la actividad biológica de anticuerpos en ADCC MOA a través de la luciferasa producida como resultado de la activación de la vía NFAT; la actividad de luciferasa en la célula efectora se cuantifica con lectura de luminiscencia. La señal es alta, el fondo del ensayo es bajo.

Se incubaron diluciones en serie de GPRC5D hu Abs durante 6 horas de inducción a 37°C con células efectoras Jurkat diseñadas (células efectoras de bioensayo de ADCC), con células diana de bioensayo de ADCC (que expresan GPRC5D). Se cuantificó la actividad de luciferasa usando el reactivo Bio-GloTM.

Los resultados se presentan en la **Figura 11**, que muestra que estos anticuerpos humanizados indujeron fuertes actividades de ADCC en líneas celulares que sobreexpresan GPRC5D y líneas celulares endógenas de MM (mieloma múltiple).

Ejemplo 9. Internalización de anticuerpos humanizados

Este ejemplo sometió a prueba los anticuerpos humanizados para sus actividades de inducción de internacionalización. El ejemplo usó un nuevo colorante sensor de pH hidrófilo y brillante (colorante pHab), que no es fluorescente a pH neutro pero se vuelve altamente fluorescente a pH ácido con la internalización. Se puede utilizar para detectar el proceso de internalización. Las células NCI-H929 y MM.1R expresaron endógenamente GPRC5D humano como células diana, se añadió el anticuerpo de detección marcado con colorante pHAb para evaluar la internalización del anticuerpo GPRC5D hu in vitro.

Se incubaron diluciones en serie de anticuerpos GPRC5D hu durante 24 horas a 37°C. Se detectó actividad de luciferasa. Los resultados, en la **Figura 12**, muestran que estos anticuerpos humanizados tienen actividades de internalización muy fuertes tanto para las líneas celulares que sobreexpresan GPRC5D como para las líneas celulares endógenas de MM.

Ejemplo 10. Actividad de destrucción de GPRC5D ADC

Este ejemplo sometió a prueba dos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para sus actividades de eliminación de células diana. Estos ADC incluían 37B9C4 y 58F9G10, respectivamente, conjugados con el fármaco tóxico Monometil auristatina E (MMAE).

Se sembraron las células de ingeniería HEK293 y NCI-H929 que expresan GPRC5D humano (HEK293/H_GPRC5D y NCI-H929/H_GPRC5D), las células MM.1R y GPRC5D que expresan endógenamente NCI-H929 en una placa de 96 pocillos a 3000~4000 células por pocillo. Se trataron las células con 37B9C4-MMAE y 58F9G10-MMAE en concentraciones respectivas durante 5 días. Se midió la viabilidad celular con CellTiteseeded en una placa de 96 pocillos a 3000~4000 células por pocillo con reactivo r-Glo. Se detectó la actividad de luciferasa por Envision. Los resultados, en **Figura 13** y la **Tabla 12**, muestran que estos anticuerpos humanizados tienen actividades letales muy fuertes.

Tabla 12. Actividades de destrucción de ADC

	Hek-293/ H_GPRC5D (IC50, nM)	MM.1R (IC50, nM)	NCI-H929 (IC50, nM)	NCI-H929/ GPRC5D (IC50, nM)
37B9C4-MMAE	0.025	0.14	0.23	0.11
58F9G10-MMAE	0.026	0.07	0.99	0.14

Ejemplo 11. Actividades antitumorales in vivo

Este ejemplo usó un modelo animal CDX para someter a prueba las actividades antitumorales del anticuerpo 37B9C4 (H1L1).

En este estudio, se usaron ratones NCG hembra de 6-8 semanas (Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd). Se inoculó cada ratón por vía subcutánea en la axila derecha (lateral) con células tumorales MM.1R (2x10⁶) en 0.1 ml de PBS con matrigel (V:V=1:1) para el desarrollo del tumor. Se agruparon al azar los animales cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 60 mm³, luego se inició el tratamiento para el estudio de eficacia. Se administró 37B9C4 a dosis de 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg vía intravenosa (i.v.) al día 0, día 7, día 14. El experimento finalizó el día 19 cuando el volumen tumoral promedio en el grupo de vehículo fue superior a 2000 mm³. El volumen tumoral promedio del grupo PBS, grupo 37B9C4 (1 mg/kg), grupo 37B9C4 (3 mg/kg) y grupo 37B9C4 (10 mg/kg) era 2498.58 mm³, 1196.15 mm³, 0.00 mm³ (6/6 CR), y 0.00 mm³ (6/6 CR) respectivamente. Se midió el tamaño del tumor tres veces por semana en dos dimensiones usando un calibre y el volumen se expresó en mm³ utilizando la fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$ donde a y b eran los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Los puntos de datos representan la media del grupo (n=6), las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

El peso corporal de los ratones portadores de tumores MM.1R se controló regularmente como una medida indirecta de toxicidad. La **Figura 14A** muestra la curva de

crecimiento tumoral de ratones portadores de tumores MM.1R después de la administración de 37B9C4. El anticuerpo inhibió el crecimiento tumoral de forma dependiente de la dosis en este modelo de tumor, y logró una inhibición tumoral completa a o por encima de 3 mg/kg.

5 Los cambios detallados del peso corporal y el cambio relativo del peso corporal de los ratones portadores del tumor MM.1R después de la administración se muestran en la **Figura 14B**. Durante el período de administración, todos los grupos de ratones no tuvieron una pérdida de peso corporal significativa, y los ratones del grupo de administración tuvieron buena tolerancia, lo que demuestra la seguridad del tratamiento.

* * *

10 La divulgación no debe limitarse en cuanto a su alcance por las realizaciones específicas descritas que tienen por objeto únicamente ser simples ilustraciones de aspectos individuales de la divulgación y se encuentra dentro del alcance de la presente divulgación cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones en los
15 métodos y composiciones de la presente divulgación sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por lo tanto, se pretende que la presente divulgación cubra las modificaciones y variaciones de esta divulgación siempre que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

20 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente se incorpora por referencia.

25

30

35