

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 487 882

a nome: Janssen Biotech, Inc.

a: Horsham, PA 19044 - USA

dal titolo: Anticorpi anti-gprc5d, molecole leganti l'antigene bispecifiche che legano GPRC5D e CD3, e usi di essi.

DESCRIZIONE

Campo tecnico

La divulgazione fornita nel presente contesto riguarda anticorpi monoclonali che legano specificamente il recettore accoppiato alla proteina G classe C gruppo 5 membro D (GPRC5D), anticorpi multispecifici che legano specificamente GPRC5D e il determinante del cluster 3 (CD3), e metodi di produzione e uso degli anticorpi descritti.

Sfondo

Il mieloma multiplo (MM, Multiple Myeloma) è il secondo tumore maligno ematologico più comune e costituisce il 2% di tutti i decessi per cancro. Il MM è una malattia eterogenea e provocata principalmente da traslocazioni cromosomiche, tra le altre cose t(11; 14), t(4; 14), t(8;14), del(13), del(17) (Drach et al., (1998) Blood 92(3):802-809; Gertz et al., (2005) Blood 106(8):2837-2840; Facon et al., (2001) Blood 97(6): 1566-1571). I pazienti affetti da MM possono manifestare una varietà di sintomi correlati alla malattia, a causa di infiltrazione del midollo osseo, distruzione ossea, insufficienza renale, immunodeficienza e l'onere

psicosociale di una diagnosi di cancro. Nel 2006, il tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni per il mieloma multiplo era approssimativamente il 34%, evidenziando che MM è una malattia difficile da trattare per la quale attualmente non vi sono opzioni curative.

Il recettore accoppiato alla proteina G, classe C, gruppo 5, membro D (GPRC5D) è un GPCR orfano, atipico, di classe C identificato per la prima volta nel 2001 (Bräuner-Osborne et al. *Biochim Biophys Acta*. 1518(3):237-248, 2001). GPRC5D e altri GPCR del gruppo 5 hanno domini ammino-terminali insolitamente corti per i recettori di classe C e, pertanto, si prevede che siano conformazionalmente simili ai recettori di classe A. Da questo punto di vista sono unici, con omologia di sequenza con i GPCR di classe C e topologia strutturale prevista paragonabile ai recettori di classe A. Le conseguenze funzionali dell'attivazione di GPRC5D non sono state descritte e il ligando rimane sconosciuto. Il gene ha tre esoni ed è ubicato sul cromosoma 12p13.3 negli esseri umani. Il recettore GPRC5D è altamente conservato fra le varie specie e condivide il 92% di identità con il recettore GPRC5D della scimmia *cynomolgus*.

L'mRNA di GPRC5D è espresso prevalentemente in tutte le plasmacellule maligne dei pazienti con MM (Atamaniuk JA et al. *Eur J Clin Invest* 42(9) 953-960; 2012; Frigyesiblood e Cohen, et al. *Hematology* 18(6): 348-35; 2013). L'espressione di GPRC5D è variabile fra i pazienti e si correla bene con il carico delle plasmacellule e con le aberrazioni genetiche come la delezione di Rb-1 (Atamaniuk JA et al. *Eur J Clin Invest* 42(9) 953-960; 2012).

Questa espressione esclusiva di GPRC5D sulla linea delle plasmacellule lo designa come bersaglio ideale per gli anticorpi anti-mieloma.

WO 2016/090329 A2 disamina anticorpi che si legano a GPRC5D e i metodi di uso degli stessi. WO 2016/036937 A1 discute gli anticorpi che si legano a CD123 e CD3.

Sommario

I riferimenti a metodi di trattamento mediante terapia o chirurgia o metodi di diagnosi in questa descrizione devono essere interpretati come riferimenti a composti, composizioni farmaceutiche e medicinali della presente invenzione per l'uso in questi metodi.

L'invenzione fornisce un anticorpo isolato, o un suo frammento legante l'antigene, che si lega specificamente al recettore accoppiato alla proteina G di classe C gruppo 5 membro D (GPRC5D), in cui l'anticorpo o il frammento legante l'antigene di esso comprende una regione della catena pesante variabile (VH) della ID di SEQ n. 55 e una regione della catena leggera variabile (VL) di ID di SEQ n. 58.

L'invenzione fornisce anche un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 isolato comprendente:

- a) una prima catena pesante (HC1);
- b) una seconda catena pesante (HC2);
- c) una prima catena leggera (LC1); e
- d) una seconda catena leggera (LC2),

in cui HC1 e LC1 si accoppiano per formare un primo sito legante l'antigene che lega specificamente CD3, e HC2 e LC2 si accoppiano per formare un secondo sito legante l'antigene che lega specificamente GPRC5D, o un

frammento legante bispecifico GPRC5D x CD3 di esso, in cui HC1 comprende ID di SEQ n. 25 e LC1 comprende ID di SEQ n. 26, e in cui HC2 comprende ID di SEQ n. 55 e LC2 comprende ID di SEQ n. 58.

L'invenzione fornisce inoltre una cellula isolata che esprime l'anticorpo o il frammento legante bispecifico o il frammento legante l'antigene dell'invenzione.

L'invenzione fornisce anche l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico dell'invenzione per l'uso nel trattamento del cancro.

L'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o frammento legante bispecifico dell'invenzione e un veicolante farmaceuticamente accettabile.

L'invenzione fornisce un metodo per generare l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico dell'invenzione mediante la coltura della cellula isolata dell'invenzione.

L'invenzione fornisce inoltre uno o più polinucleotidi sintetici isolati che codificano HC1, HC2, LC1 e LC2 dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o del frammento legante bispecifico dell'invenzione.

L'invenzione fornisce un kit comprendente l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico dell'invenzione e/o uno o più polinucleotidi dell'invenzione e impaccamento per lo stesso.

Nel presente contesto sono forniti anticorpi che si legano specificamente a GPRC5D e frammenti leganti l'antigene di esso. Vengono anche descritti polinucleotidi correlati capaci di codificare gli anticorpi GPRC5D specifici e i frammenti leganti l'antigene forniti, cellule che esprimono gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene forniti, nonché vettori associati e anticorpi e frammenti leganti

l'antigene tracciati in modo rilevabile. In aggiunta, vengono descritti i metodi di uso degli anticorpi e frammenti leganti l'antigene forniti. Per esempio, gli anticorpi GPRC5D-specifici e i frammenti leganti l'antigene possono essere usati per diagnosticare o monitorare la progressione, la regressione o la stabilità del cancro che esprime GPRC5D; per determinare se o no un paziente debba essere trattato per il cancro; o per determinare se o no un soggetto è affetto da un cancro che esprime GPRC5D e dunque può essere incline al trattamento con una terapia anticancro specifica per GPRC5D, come gli anticorpi multispecifici contro GPRC5D e CD3 descritti nel presente contesto.

Nel presente contesto sono inoltre forniti anticorpi multispecifici che si legano immunospecificamente a GPRC5D e CD3 e frammenti legante l'antigene multispecifici di essi. Vengono anche descritti polinucleotidi correlati capaci di codificare gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 forniti, cellule che esprimono gli anticorpi forniti, nonché vettori associati e anticorpi multispecifici tracciati in modo rilevabile. In aggiunta, vengono descritti metodi di uso degli anticorpi multispecifici forniti. Per esempio, gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 possono essere usati per diagnosticare o monitorare la progressione, la regressione o la stabilità del cancro che esprime GPRC5D; per determinare se o no un paziente debba essere trattato per il cancro; o per determinare se o no un soggetto è affetto da un cancro che esprime GPRC5D e dunque può essere incline al trattamento con una terapia anticancro specifica per GPRC5D, come gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 descritti nel presente contesto.

Anticorpi GPRC5D-specifici

Nel presente contesto vengono descritti anticorpi isolati e frammenti leganti l'antigene specifici per GPRC5D. Gli anticorpi GPRC5D-specifici e i

frammenti leganti l'antigene legano il GPRC5D umano. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi GPRC5D-specifici e i frammenti leganti l'antigene legano il GPRC5D umano e il GPRC5D della scimmia cynomolgus. Gli anticorpi GPRC5D-specifici e i frammenti leganti l'antigene si legano a uno o più residui di un polipeptide avente la sequenza di amminoacidi di ID di SEQ n. 22. Questo anticorpo GPRC5D-specifico o frammento legante l'antigene può indurre ADCC *in vitro* con una EC₅₀ di 28 nM o minore.

La Tabella 1 fornisce un sommario di esempi di alcuni anticorpi GPRC5D-specifici descritti nel presente contesto:

Tabella 1. Sequenze della CDR di mAb generati contro GPRC5D umano

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GCSB81	SYAIS (ID di SEQ n. 1)	GIIPFGTANYAQKF QG (ID di SEQ n. 5)	ESRWRGYKLD (ID di SEQ n. 9)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)
GC5B465 GC5B597	NYWMS (ID di SEQ n. 2)	GISYSGGSKYYASS VKG (ID di SEQ n. 6)	AAFDGRRRAVRLD (ID di SEQ n. 10)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)
GCSB483 GC5B599	SYFIG (ID di SEQ n. 3)	IYPGKSDTRYSPSF QG (ID di SEQ n. 7)	VYSFGGRHKALFDY (ID di SEQ n. 11)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B596	GYTMN (ID di SEQ n. 4)	LINPYNSDTNYAQKL QG (ID di SEQ n. 8)	VALRVALDY (ID di SEQ n. 12)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)
GCSB382	DYGMH (ID di SEQ n. 61)	AIKYSGGSTYYADSV KG (ID di SEQ n. 67)	RAESGPGLDY (ID di SEQ n. 72)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (ID di SEQ n. 98)	WASTRES (ID di SEQ n. 78)	QQYYSTPLT (ID di SEQ n. 80)
GCSB379	NYWMS (ID di SEQ n. 2)	GISYSGGSKYYADSV KG (ID di SEQ n. 28)	AAWDFGRRRAVRLD Y (ID di SEQ n. 30)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)
GCSB373	SYWIG (ID di SEQ n. 27)	IYPGDS TRYSPSF QG (ID di SEQ n. 29)	IGFYGRSFRIFDY (ID di SEQ n. 73)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GCSB376	SYWIG (ID di SEQ n. 27)	IYPGDS TRYSPSF QG (ID di SEQ n. 29)	VYSFGGRHKALFDY (ID di SEQ n. 11)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B385	GYAMS (ID di SEQ n. 62)	AISGSGGSTYYADSV KG (ID di SEQ n. 68)	VDRSFGRSRYTLDY (ID di SEQ n. 74)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GCSB370 GC5B598	SYGIS (ID di SEQ n. 63)	GIIPFGNINYAQKFQ G (ID di SEQ n. 69)	VSRFRKFAYFYFDY (ID di SEQ n. 75)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (ID di SEQ n. 98)	WASTRES (ID di SEQ n. 78)	QQYYSTPLT (ID di SEQ n. 80)
GCSB602	GYSFTGYTMN (ID di SEQ n. 64)	LINPYNGDTN (ID di SEQ n. 70)	VALRVALDY (ID di SEQ n. 12)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)
GCSB603	SYAMS (ID di SEQ n. 65)	AISGSGGSTYYADS VKG (ID di SEQ n. 68)	SNFLPVVFDY (ID di SEQ n. 76)	RASQSVRKSLA (ID di SEQ n. 95)	TASNRAT (ID di SEQ n. 79)	QQYFRAPIT (ID di SEQ n. 81)
GCSB601	GFSLTSYNVH (ID di SEQ n. 66)	VIWAGGSTNYNSAL MS (ID di SEQ n. 71)	DGIRLRFAY (ID di SEQ n. 77)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)

L'anticorpo GPRC5D-specifico, o un frammento legante l'antigene di esso, dell'invenzione comprende una catena pesante comprendente una CDR1, una CDR2 e una CDR3 dell'anticorpo GC5B596 descritto nella Tabella 1. È divulgato nel presente contesto un anticorpo GPRC5D-specifico, o un frammento legante l'antigene di esso, comprendente una catena pesante comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 di uno qualsiasi degli anticorpi descritti nella Tabella 1. L'anticorpo GPRC5D-specifico, o un frammento legante l'antigene di esso, dell'invenzione comprende una catena pesante comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 dell'anticorpo GC5B596 descritto nella Tabella 1 e una catena leggera comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 dell'anticorpo GC5B596 descritto nella Tabella 1. È divulgato nel presente contesto un anticorpo GPRC5D-specifico, o un frammento legante l'antigene di esso, comprendente una catena pesante comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 di uno qualsiasi degli anticorpi descritti nella Tabella 1 e una catena leggera comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 di uno qualsiasi degli anticorpi descritti nella Tabella 1. L'anticorpo GPRC5D-specifico o un frammento legante l'antigene di esso possono competere per il legame al GPRC5D con un anticorpo o frammento legante l'antigene comprendente una catena pesante comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 di uno qualsiasi degli anticorpi descritti nella Tabella 1 e una catena leggera comprendente una CDR1, una CDR2, e una CDR3 di uno qualsiasi degli anticorpi descritti nella Tabella 1.

La classe IgG è divisa in quattro isotipi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 negli esseri umani. Condividono più del 95% di omologia nelle sequenze di amminoacidi delle regioni Fc ma mostrano differenze rilevanti nella composizione degli amminoacidi e nella struttura della regione cerniera. La regione Fc media

funzioni effettrici, come citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity), e citotossicità complemento-dipendente (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity). Nell'ADCC, la regione Fc di un anticorpo si lega a recettori dell'Fc (FcγR) sulla superficie di cellule effettrici immunitarie come cellule natural killer e macrofagi, portando alla fagocitosi o lisi delle cellule mirate. Nella CDC, gli anticorpi uccidono le cellule mirate innescando la cascata del complemento in corrispondenza della superficie delle cellule. Gli anticorpi descritti nel presente contesto includono anticorpi con le peculiarità descritte dei domini variabili in combinazione con qualsiasi degli isotipi IgG, incluse versioni modificate in cui la sequenza dell'Fc è stata modificata per influenzare le varie funzioni effettrici.

Per molte applicazioni di anticorpi terapeutici, le funzioni effettrici mediate da Fc non sono parte del meccanismo d'azione. Queste funzioni effettrici mediate da Fc possono essere dannose e potenzialmente rappresentare un rischio per la sicurezza, provocando tossicità al di fuori del meccanismo. La modifica delle funzioni effettrici può essere conseguita ingegnerizzando le regioni Fc per ridurre il loro legame a FcγR o ai fattori del complemento. Il legame di IgG ai FcγR attivanti (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa e FcγRIIIb) e inibitori (FcγRIIb) o al primo componente del complemento (C1q) dipende dai residui ubicati nella regione cerniera e nel dominio CH2. Mutazioni possono essere introdotte in IgG1, IgG2 e IgG4 per ridurre o silenziare le funzionalità di Fc. Gli anticorpi descritti nel presente contesto possono includere queste modifiche.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo comprende una regione Fc con una o più delle seguenti proprietà: (a) funzione effettrice ridotta in confronto a Fc progenitore; (b) ridotta affinità per Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb e/o Fcγ

RIIIa, (c) ridotta affinità per FcγRI (d) ridotta affinità per FcγRIIa (e) ridotta affinità per FcγRIIb, (f) ridotta affinità per FcγRIIIb o (g) ridotta affinità per FcγRIIIa.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene sono IgG o derivati di esse, ad es., isotipi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In alcune forme di realizzazione in cui l'anticorpo ha un isotipo IgG1, l'anticorpo contiene la/le sostituzione/i L234A e L235A e/o K409R nella sua regione Fc. In alcune forme di realizzazione in cui l'anticorpo ha un isotipo IgG4, l'anticorpo contiene le sostituzioni S228P, L234A e L235A nella sua regione Fc. Gli anticorpi descritti nel presente contesto possono includere queste modifiche.

In aggiunta agli anticorpi GPRC5D-specifici, e frammenti leganti l'antigene descritti, sono fornite sequenze di polinucleotidi capaci di codificare gli anticorpi e frammenti leganti l'antigene descritti. Sono anche forniti vettori comprendenti i polinucleotidi descritti, così come cellule che esprimono gli anticorpi GPRC5D-specifici o i frammenti leganti l'antigene forniti nel presente contesto. Descritte sono anche cellule capaci di esprimere i vettori divulgati. Queste cellule possono essere cellule di mammifero (come cellule 293F, cellule CHO), cellule di insetto (come cellule Sf7), cellule di lievito, cellule di pianta, o cellule di batteri (come E. coli). Gli anticorpi descritti possono anche essere prodotti da cellule di ibridoma.

Metodi di uso degli anticorpi GPRC5D-specifici

Vengono anche divulgati metodi di uso di anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene. Particolari anticorpi per l'uso nei metodi disaminati in questa sezione includono quelli con l'insieme di CDR descritto per gli anticorpi nella Tabella 1. Per esempio, questi anticorpi o frammenti leganti l'antigene possono essere utili nel trattamento del cancro, interferendo con le interazioni tra GPRC5D-recettore o dove l'anticorpo è coniugato a una tossina, mirando così la

tossina verso il cancro che esprime GPRC5D. Inoltre, questi anticorpi o frammenti leganti l'antigene possono essere utili per rilevare la presenza di GPRC5D in un campione biologico, come sangue o siero; per quantificare la quantità di GPRC5D in un campione biologico, come sangue o siero; per la diagnosi del cancro che esprime GPRC5D; determinare un metodo di trattamento di un soggetto affetto da cancro; o monitorare la progressione del cancro che esprime GPRC5D in un soggetto. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D può essere un linfoma, come il mieloma multiplo (MM). I metodi descritti possono essere compiuti prima che il soggetto riceva il trattamento per il cancro che esprime GPRC5D, come il trattamento con un anticorpo multispecifico contro GPRC5D e CD3. Per di più, i metodi descritti possono essere compiuti dopo che il soggetto riceve il trattamento per il cancro che esprime GPRC5D, come il trattamento con un anticorpo multispecifico contro GPRC5D e CD3 descritto nel presente contesto.

I metodi descritti per rilevare GPRC5D in un campione biologico includono l'esposizione del campione biologico a uno o più anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto.

I metodi descritti per la diagnosi del cancro che esprime GPRC5D in un soggetto implicano anche l'esposizione del campione biologico a uno o più anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto; tuttavia, i metodi includono anche la quantificazione della quantità di GPRC5D presente nel campione; confrontando la quantità di GPRC5D presente nel campione con un campione standard o di riferimento noto; e determinare se i livelli di GPRC5D del soggetto rientrano nei livelli di GPRC5D associati al cancro.

Vengono anche descritti metodi per monitorare il cancro che esprime

GPRC5D in un soggetto. I metodi descritti includono l'esposizione del campione biologico a uno o più anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto; quantificare la quantità di GPRC5D presente nel campione che è legata dall'anticorpo o dal suo frammento legante l'antigene; confrontando la quantità di GPRC5D presente nel campione con un campione standard o di riferimento noto o con la quantità di GPRC5D in un campione simile precedentemente ottenuto dal soggetto; e determinare se i livelli di GPRC5D del soggetto sono indicativi di progressione del cancro, regressione o malattia stabile in base alla differenza nella quantità di GPRC5D nei campioni confrontati.

I campioni ottenuti o derivati dai soggetti sono campioni biologici quali urina, sangue, siero, plasma, saliva, ascite, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti, cellule non associate ai tessuti, tessuti, tessuto del tumore resecato chirurgicamente, biopsie, campioni di agoaspirato o preparati istologici.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici descritti o i frammenti leganti l'antigene possono essere tracciati per l'uso con i metodi descritti o con altri metodi noti agli esperti dell'arte. Per esempio, gli anticorpi descritti nel presente contesto, o i frammenti leganti l'antigene di essi, possono essere tracciati con un radiotracciante, un tracciante fluorescente, un tag epitopo, biotina, un tracciante cromoforo, un tracciante ECL, un enzima, rutenio, ^{111}In DOTA, ^{111}In -acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA), perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina e beta-galattosidasi, o poliistidina o simili a tali traccianti noti nell'arte.

Kit di anticorpi GPRC5D-specifici

Nel presente contesto vengono descritti kit che includono gli anticorpi GPRC5D-specifici divulgati o i frammenti leganti l'antigene di essi. I kit descritti possono essere usati per compiere i metodi di uso degli anticorpi GPRC5D-

specifici o dei frammenti leganti l'antigene forniti nel presente contesto, oppure altri metodi noti agli esperti dell'arte. I kit descritti possono includere gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto e i reagenti per l'uso per rilevare la presenza di GPRC5D in un campione biologico. Di conseguenza, i kit descritti possono includere uno o più degli anticorpi, o un frammento/frammenti legante/i l'antigene di essi, descritti nel presente contesto e un recipiente per contenere l'anticorpo o il frammento quando non in uso, istruzioni per l'uso dell'anticorpo o del frammento, l'anticorpo o il frammento fissato a un supporto solido e/o forme dell'anticorpo o del frammento tracciate in modo rilevabile, come descritto nel presente contesto.

Anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3

Il reindirizzamento di linfociti T verso cellule di MM che esprimono GPRC5D tramite il complesso TCR/CD3 rappresenta un approccio alternativo interessante. Il complesso TCR/CD3 dei linfociti T consiste in un eterodimero TCR alfa (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) coespresso in corrispondenza della superficie della cellula con le subunità invariante di CD3 tracciate gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ), ed eta (η). CD3 ϵ umano è descritto sotto UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Un anticorpo anti CD3 ϵ descritto nello stato dell'arte è SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 reagisce con il CD3 sia dei primati sia degli esseri umani. SP34 è disponibile da Pharmingen. Un ulteriore anticorpo anti CD3 descritto nello stato dell'arte è UCHT-1 (si veda WO2000041474). Un ulteriore anticorpo anti CD3 descritto nello stato dell'arte è BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; usato negli studi di fase I/II di GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 differisce da UCHT-1 e BC-3 in quanto SP-34 riconosce un epitopo presente unicamente sulla catena ϵ

di CD3 (si veda Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047) laddove UCHT-1 e BC-3 riconoscono un epitopo a cui contribuiscono sia le catene ϵ che γ . La sequenza di un anticorpo con la stessa sequenza dell'anticorpo SP34 è menzionata

in WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 e WO2010037838. Una sequenza identica al 96% alla VH dell'anticorpo SP34 è menzionata in US8236308 (WO2007042261).

Nel presente contesto vengono descritti anticorpi multispecifici isolati che legano GPRC5D e CD3 ("anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3") e i frammenti multispecifici leganti l'antigene di essi. Viene fornito un anticorpo isolato, o un frammento legante l'antigene di esso, che si lega immunospecificamente a GPRC5D.

In alcune forme di realizzazione, il braccio GPRC5D-specifico dell'anticorpo multispecifico lega GPRC5D umano e GPRC5D della scimmia cynomolgus. In alcune forme di realizzazione, il braccio GPRC5D-specifico degli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 o dei frammenti leganti l'antigene lega il dominio extracellulare del GPRC5D umano. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante l'antigene è un anticorpo bispecifico o un frammento legante l'antigene. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 isolato comprendente: a) una prima catena pesante (HC1); b) una seconda catena pesante (HC2); c) una prima catena leggera (LC1); e d) una seconda catena leggera (LC2), in cui HC1 e LC1 si accoppiano per formare un primo sito legante l'antigene che lega immunospecificamente GPRC5D, e HC2 e LC2 si accoppiano per formare un secondo sito legante l'antigene che lega immunospecificamente CD3, o un frammento legante bispecifico GPRC5D x CD3 di esso. In un'altra

forma di realizzazione, viene fornita una cellula isolata che esprime l'anticorpo o il frammento legante bispecifico. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante GPRC5D (o "braccio GPRC5D-specifico") dell'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 è derivato da un anticorpo GPRC5D descritto nel presente contesto (per esempio, da un anticorpo avente le sequenze della CDR elencate nella Tabella 1).

In alcune forme di realizzazione, il braccio GPRC5D-specifico degli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 o dei frammenti leganti l'antigene sono IgG o derivati di esse. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 (o "braccio CD3-specifico") dell'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 è derivato dall'anticorpo monoclonale di topo SP34, un isotipo IgG3/lambda di topo. (K.R. Abhinandan e A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839). In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 dell'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 comprende un dominio VH e un dominio VL selezionati dalla Tabella 2.

Tabella 2. Catene pesanti e catene leggere dell'anticorpo CD3-specifico e del frammento legante l'antigene

VH	VL
CD3B219 (ID di SEQ n. 99): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	CD3B219 (ID di SEQ n. 100): QTVWTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLGGVQPEDEAEYYCALWYSNLWFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

La classe IgG è divisa in quattro isotipi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 negli esseri umani. Condividono più del 95% di omologia nelle sequenze di amminoacidi delle regioni Fc ma mostrano differenze rilevanti nella composizione degli amminoacidi e nella struttura della regione cerniera. La regione Fc media funzioni effettrici, come citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity), e citotossicità complemento-dipendente (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity). Nell'ADCC, la regione Fc di un anticorpo si lega a recettori dell'Fc (FcγR) sulla superficie di cellule effettrici immunitarie come cellule natural killer e macrofagi, portando alla fagocitosi o lisi delle cellule mirate. Nella CDC, gli anticorpi uccidono le cellule mirate innescando la cascata del complemento in corrispondenza della superficie delle cellule.

Per molte applicazioni di anticorpi terapeutici, le funzioni effettrici mediate da Fc non sono parte del meccanismo d'azione. Queste funzioni effettrici mediate

da Fc possono essere dannose e potenzialmente rappresentare un rischio per la sicurezza, provocando tossicità al di fuori del meccanismo. La modifica delle funzioni effettrici può essere conseguita ingegnerizzando le regioni Fc per ridurre il loro legame a FcγR o ai fattori del complemento. Il legame di IgG ai FcγR attivanti (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa e FcγRIIIb) e inibitori (FcγRIIb) o al primo componente del complemento (C1q) dipende dai residui ubicati nella regione cerniera e nel dominio CH2. Mutazioni possono essere introdotte in IgG1, IgG2 e IgG4 per ridurre o silenziare le funzionalità di Fc.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo comprende una regione Fc con una o più delle seguenti proprietà: (a) funzione effettrice ridotta in confronto a Fc progenitore; (b) ridotta affinità per Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb e/o Fcγ RIIIa, (c) ridotta affinità per FcγRI (d) ridotta affinità per FcγRIIa (e) ridotta affinità per FcγRIIb, (f) ridotta affinità per Fcγ RIIIb o (g) ridotta affinità per FcγRIIIa.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo CD3-specifico o il frammento legante l'antigene da cui deriva il braccio CD3-specifico dell'anticorpo multispecifico derivato è IgG o un derivato di essa. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo CD3-specifico o il frammento legante l'antigene da cui deriva il braccio CD3-specifico dell'anticorpo multispecifico è IgG1 o un derivato di essa. In alcune forme di realizzazione, per esempio, la regione Fc dell'anticorpo IgG1 CD3-specifico da cui deriva il braccio legante CD3 comprende le sostituzioni L234A, L235A e F405L nella sua regione Fc. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo CD3-specifico o il frammento legante l'antigene da cui deriva il braccio CD3-specifico dell'anticorpo multispecifico è IgG4 o un derivato di essa. In alcune forme di realizzazione, per esempio, la regione Fc dell'anticorpo IgG4 CD3-specifico da cui deriva il braccio legante CD3 comprende le sostituzioni S228P,

L234A, L235A, F405L e R409K nella sua regione Fc. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo CD3-specifico o il frammento legante l'antigene da cui deriva il braccio CD3-specifico dell'anticorpo multispecifico da cui deriva lega CD3ε su cellule T umane primarie e/o cellule T di cynomolgus primarie. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo CD3-specifico o il frammento legante l'antigene da cui deriva il braccio CD3-specifico dell'anticorpo multispecifico attiva le cellule T CD4+ umane primarie e/o le cellule T CD4+ di cynomolgus primarie.

In aggiunta agli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3, vengono fornite anche sequenze di polinucleotidi capaci di codificare gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un polinucleotide sintetico isolato che codifica per HC1, HC2, LC1 o LC2 dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o del frammento legante bispecifico. Sono anche forniti vettori comprendenti i polinucleotidi descritti, così come cellule che esprimono gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 forniti nel presente contesto. Descritte sono anche cellule capaci di esprimere i vettori divulgati. Queste cellule possono essere cellule di mammifero (come cellule 293F, cellule CHO), cellule di insetto (come cellule Sf7), cellule di lievito, cellule di pianta, o cellule di batteri (come E. coli). Gli anticorpi descritti possono anche essere prodotti da cellule di ibridoma. In alcune forme di realizzazione, vengono forniti metodi per generare l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico coltivando le cellule.

Nel presente contesto sono inoltre fornite composizioni farmaceutiche comprendenti anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 o frammenti leganti l'antigene e un veicolante farmaceuticamente accettabile.

Metodi di uso degli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3

Vengono anche divulgati metodi di uso degli anticorpi multispecifici GPRC5D

x CD3 descritti e dei frammenti leganti l'antigene multispecifici di essi. Per esempio, gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 e i frammenti leganti l'antigene multispecifici di essi possono essere utili nel trattamento di un cancro che esprime GPRC5D in un soggetto che necessita di essi. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D è un linfoma, come il mieloma multiplo.

I metodi descritti per il trattamento del cancro che esprime GPRC5D in un soggetto che necessita di essi includono la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 descritto o di un frammento legante l'antigene multispecifico di esso. In alcune forme di realizzazione il soggetto è un mammifero, preferibilmente un essere umano. Nelle forme di realizzazione preferite vengono forniti metodi per trattare un soggetto affetto da cancro somministrando una quantità terapeuticamente efficace dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o del frammento legante l'antigene bispecifico a un paziente che necessita di esso per un periodo di tempo sufficiente a trattare il cancro.

Nel presente contesto vengono inoltre forniti metodi per inibire la crescita o la proliferazione delle cellule di cancro mediante la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o di un frammento legante bispecifico per inibire la crescita o la proliferazione delle cellule di cancro.

Vengono anche forniti metodi per reindirizzare una cellula T verso una cellula di cancro che esprime GPRC5D somministrando una quantità terapeuticamente efficace dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o di un frammento legante bispecifico per reindirizzare una cellula T verso un cancro.

Kit di anticorpi specifici GPRC5D x CD3

Nel presente contesto vengono descritti kit che includono gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 divulgati. I kit descritti possono essere usati per compiere i metodi di uso degli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 forniti nel presente contesto, oppure altri metodi noti agli esperti dell'arte. In alcune forme di realizzazione, i kit descritti possono includere gli anticorpi descritti nel presente contesto e i reagenti per l'uso nel trattamento di un cancro che esprime GPRC5D. Di conseguenza, i kit descritti possono includere uno o più degli anticorpi multispecifici, o un frammento/frammenti legante/i l'antigene multispecifico/i di essi, descritti nel presente contesto, e un recipiente per contenere l'anticorpo o il frammento quando non in uso, e/o istruzioni per l'uso dell'anticorpo o del frammento, l'anticorpo o il frammento fissato a un supporto solido, e/o forme dell'anticorpo o del frammento tracciate in modo rilevabile, come descritto nel presente contesto.

Breve descrizione dei disegni

Fig. 1: profilo di legame dipendente dalla concentrazione di mAb anti-GPRC5D selezionati contro GPRC5D umano e cellule HEK 293 non trasfettate. È stato anche osservato che tre mAb, GC5B36, GC5B168 e GC5B205, si legano alle cellule HEK293 non trasfettate (GPRC5D null).

Fig. 2. Legame dose-dipendente degli anticorpi bispecifici anti-GPCR5D x CD3 alle cellule umane HEK293F GPRC5D.

Fig. 3 Il profilo di legame degli anticorpi bispecifici sulle cellule MMIR e H929 è stato confrontato con le cellule HEK293 con sovraespressione di GPCR5D umano e con le cellule HEK293 non trasfettate usando FACS.

Fig. 4A e 4B. Citotossicità mediata dalle cellule T e attivazione da parte delle cellule T di anticorpi anti-GPCR5D x CD3 contro le cellule che esprimono GPCR5D umano.

Fig. 5Ae5B Citotossicità mediata dalle cellule T e attivazione da parte delle cellule T di anticorpi anti-GPCR5D x CD3 contro le cellule che esprimono cyno GPCR5D.

Fig. 6A e 6B. Gli Ab GPCR5DxCD3 uccidono efficacemente le cellule H929 nel modello murino di NSG profilattico. GCDB32 (6A) e GCDB35 (6B) hanno dato come risultato l'inibizione completa della crescita del tumore alla dose di 10 ug, con GCDB32 anche capace di inibire la crescita del tumore al 100% anche alla dose di 1 ug.

Fig. 7A e 7B. Comparazione della potenza in assenza (7A) e presenza (7B) del blocco di Fc.

Fig. 8A-8D. Legame di GCDB32 GCDB35, GCDB40 e GCDB43 a recettori di Fcγ.

Fig. 9A e 9B. Valutazione del legame FACS dei mAb derivati da ibridomi.

Fig. 10A e 10B. Citotossicità mediata dalle cellule T degli anticorpi bispecifici GPCR5D x CD3 contro le cellule H929.

Fig. 11A-11E. Anticorpo bispecifico GPCR5D x CD3 che si lega alle linee cellulari GPCR5D positive (H929, MM1R, LP1, OPM2) e negative (NALM6).

Fig. 12A-12D. Gli Ab bispecifici GPCR5DxCD3 sono potenti inibitori del tumore in vivo. Tutti gli Ab bispecifici GPCR5D x CD3 (GCDB32 mostrato in 12A, GCDB53 mostrato in 12B, GCDB61 mostrato in 12C e GCDB72 mostrato in 12D)

hanno inibito completamente la crescita tumorale delle cellule di mieloma multiplo (H929) alle dosi di 10 ug e 1 ug. La differenziazione è stata osservata alla dose di 0,1 ug ed è stata osservata un'inibizione della crescita del tumore dell'80% con GCDB72

Fig. 13: le linee cellulari MM1.R GPRC5D⁺ sono state colorate per 60 minuti con varie concentrazioni di anticorpi lead per misurare i profili di legame superficiale (n=3). Per catturare il segnale è stato usato Fc di IgG4 umana tracciato con ficoeritrina come anticorpo secondario (Southern Biotech, clone HP6025). Il legame è espresso come intensità di fluorescenza media geometrica normalizzata, come determinato mediante FACS. La rappresentazione grafica e l'adattamento dei dati sono stati eseguiti in GraphPad Prism 6 usando la regressione non lineare con pendenza variabile (quattro parametri) e il metodo di adattamento ai minimi quadrati.

Fig. 14A e 14B. Le linee cellulari GPRC5D⁺ sono state colorate per 60 minuti con varie concentrazioni di anticorpi FAB6300 e GC5M481 per misurare i profili di legame superficiale. Per catturare il segnale è stato usato Fc di IgG4 umana tracciato con ficoeritrina come anticorpo secondario (Southern Biotech, clone HP6025). Il legame è espresso come istogrammi (la linea nera indica l'isotipo e la linea rossa indica l'anticorpo GPRC5D specifico (Fig. 14A). La Fig. 14B mostra il motivo di legame delle molecole lead su linee cellulari GPRC5D⁺ di mieloma multiplo. La linea tratteggiata e ombreggiata indica il controllo isotipo e la linea continua indica il legame della molecola lead.

Fig. 15Ae15B. Sono state usate cellule mononucleate derivate dal midollo osseo congelato di due diversi pazienti affetti da MM per valutare il legame dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3, in confronto al controllo isotipo IgG4, alla citotossicità delle plasmacellule e all'attivazione delle cellule T. Per il saggio di

citotossicità, le cellule T del donatore sano normale sono state aggiunte in modo esogeno ai campioni di BM MNC del paziente e incubate con quattro molecole lead per 48 ore. L'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 si lega alle plasmacellule in modo dose-dipendente in tutti i campioni dei donatori e le intensità medie di fluorescenza sono state registrate sull'asse Y. Si noti la perdita di plasmacellule vive (CD138⁺) e la concomitante regolazione positiva di CD25 sulle cellule T in risposta al trattamento con anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3.

Fig. 16. Nei topi NSG sono state impiantate per via sottocutanea cellule di mieloma multiplo umano MM.1S il giorno 0. Le PBMC umane sono state inoculate per via endovenosa il giorno 7 dello studio. PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg e 50 µg/animale (equivalenti rispettivamente a 0,005, 0,05, 0,5 e 2,5 mg/kg)) e anticorpi di controllo null sono stati somministrati per via endovenosa i giorni 15, 18, 22, 24, 29, 32 e 36. I tumori sottocutanei sono stati misurati due volte a settimana e i risultati sono stati presentati come volume del tumore medio, espresso in mm³ ± SEM di ciascun gruppo. Trattamento con anticorpi GCDB72 quando dosati a 1 µg (0,05 mg/kg) ha inibito significativamente la crescita del tumore sc in confronto a PBS (TGI=64%, p≤ 0,0001). Dosi di GCDB72 di 10 µg/animale (0,5 mg/kg) e 50 µg/animale (2,5 mg/kg) hanno fatto regredire completamente la crescita del tumore (p≤0,0001). Gli anticorpi di controllo Null hanno avuto un effetto trascurabile o nullo. La significatività statistica è stata valutata usando un'ANOVA a 2 vie con comparazioni multiple usando la prova di comparazioni multiple di Tukey usando il software Graph Pad Prism (versione 6). Le differenze tra i gruppi sono state considerate significative quando il valore di probabilità (p) era ≤0,05.

Fig. 17. Il giorno 0, le cellule di mieloma multiplo umano MM.1S sono

state impiantate per via sottocutanea negli NSG. Le PBMC umane sono state inoculate per via endovenosa il giorno 7 dello studio. PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg e 50 µg/animale (equivalenti rispettivamente a 0,005, 0,05, 0,5 e 2,5 mg/kg)) e anticorpi di controllo null sono stati somministrati per via endovenosa i giorni 15, 18, 22, 24, 29, 32 e 36. Il peso corporeo è presentato come peso corporeo assoluto dall'inizio del trattamento alla fine dello studio

Descrizione dettagliata di forme di realizzazione illustrative

Definizioni

In tutta la specificazione e in tutte le rivendicazioni vengono usati vari termini riguardanti aspetti della descrizione. A tali termini deve essere dato il loro significato ordinario nell'arte, salvo altrimenti indicato. Altri termini specificamente definiti devono essere interpretati in modo coerente con le definizioni fornite nel presente contesto.

Come usato in questa specificazione e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un/uno/una", "un" e "il/lo/la" includono i referenti plurali salvo il contesto detti chiaramente altrimenti. Dunque, per esempio, un riferimento a "una cellula" include una combinazione di due o più cellule, e simili.

Il termine "circa", come usato nel presente contesto quando si fa riferimento a un valore misurabile, come una quantità, una durata temporale e simili, intende inglobare variazioni fino a $\pm 10\%$ dal valore specificato, in quanto tali variazioni sono appropriate per svolgere i metodi divulgati. Salvo altrimenti indicato, tutti i numeri che esprimono quantità di ingredienti, proprietà come peso molecolare, condizioni di reazione, e così via usati nella specificazione e nelle rivendicazioni devono essere compresi come modificati in tutti i casi mediante il termine "circa". Di conseguenza, salvo altrimenti indicato, i parametri numerici

evidenziati nella seguente specificazione e nelle rivendicazioni allegate sono approssimazioni che possono variare a seconda delle proprietà desiderate che si vogliono ottenere mediante la presente invenzione. Come minimo, e non come tentativo di limitare l'applicazione della dottrina degli equivalenti all'ambito delle rivendicazioni, ciascun parametro numerico deve essere interpretato almeno alla luce del numero di cifre significative riportate e applicando le normali tecniche di arrotondamento.

Nonostante gli intervalli numerici e i parametri che espongono l'ampio ambito dell'invenzione siano approssimazioni, i valori numerici esposti negli esempi specifici sono riportati nel modo più preciso possibile. Tuttavia, qualsiasi valore numerico contiene naturalmente certi errori, necessariamente risultanti dalla deviazione standard trovata nelle rispettive misurazioni di prova.

"Isolato" significa che un componente biologico (come un acido nucleico, un peptide o una proteina) è stato sostanzialmente separato, prodotto separatamente o purificato da altri componenti biologici dell'organismo in cui il componente è presente in natura, vale a dire altri DNA e RNA cromosomici ed extracromosomici e proteine. Gli acidi nucleici, i peptidi e le proteine che sono stati "isolati" includono dunque acidi nucleici e proteine purificati mediante metodi di purificazione standard. Gli acidi nucleici, i peptidi e le proteine "isolati" possono essere parte di una composizione ed essere ancora isolati se tale composizione non è parte dell'ambiente nativo dell'acido nucleico, del peptide o della proteina. Il termine racchiude anche acidi nucleici, peptidi e proteine preparati mediante espressione ricombinante in una cellula ospite, nonché acidi nucleici sintetizzati chimicamente. Un anticorpo o frammento legante l'antigene "isolato", come usato nel presente contesto, si riferisce a un anticorpo o frammento legante l'antigene

che è sostanzialmente privo di altri anticorpi o frammenti leganti l'antigene aventi specificità antigeniche differenti (ad esempio, un anticorpo isolato che si lega specificamente a GPRC5D è sostanzialmente privo di anticorpi che legano specificamente antigeni diversi da GPRC5D). Un anticorpo isolato che si lega specificamente a un epitopo, isoforma o variante di GPRC5D può tuttavia avere una reattività crociata con altri antigeni correlati, ad esempio di altre specie (come gli omologhi di specie GPRC5D).

"Polinucleotide", a cui ci si riferisce con i sinonimi come "molecola di acido nucleico", "nucleotidi" o "acidi nucleici", si riferisce a qualsiasi poliribonucleotide o polidesossiribonucleotide, che può essere RNA o DNA non modificato o RNA o DNA modificato. "Polinucleotidi" includono, senza limitazione, DNA a singolo e doppio filamento, DNA che è una miscela di regioni a singolo e doppio filamento, RNA a singolo e doppio filamento e RNA che è una miscela di regioni a singolo e doppio filamento, molecole ibride comprendenti DNA e RNA che possono essere a singolo filamento o, più tipicamente, a doppio filamento o una miscela di regioni a singolo e doppio filamento. In aggiunta, "polinucleotide" si riferisce a regioni a triplo filamento comprendenti RNA o DNA o sia RNA sia DNA. Il termine polinucleotide include anche DNA o RNA contenenti una o più basi modificate e DNA o RNA con catene principali modificate per stabilità o per altri motivi. Le basi "modificate" includono, per esempio, le basi tritilate e basi insolite come inosina. Può essere realizzata una varietà di modifiche al DNA e all'RNA; pertanto, "polinucleotide" racchiude forme di polinucleotidi modificate chimicamente, enzimaticamente o metabolicamente, come quelle che si trovano tipicamente in natura, nonché le forme chimiche di DNA e RNA caratteristiche di virus e cellule. "Polinucleotide" racchiude anche catene di acidi nucleici relativamente corte, a cui

ci si riferisce spesso come oligonucleotidi.

Il significato di "sostanzialmente uguali" può differire a seconda del contesto in cui il termine viene usato. Poiché esiste una probabile variazione della sequenza naturale fra catene pesanti e leggere e i geni che le codificano, ci si aspetta di trovare un certo livello di variazione all'interno delle sequenze di amminoacidi o dei geni che codificano gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto, con scarso o nessun impatto sulle loro proprietà di legame uniche (ad es., specificità e affinità). Tale aspettativa è dovuta in parte alla degenerazione del codice genetico, nonché al successo evolutivo delle variazioni conservative della sequenza di amminoacidi, che non alterano in modo apprezzabile la natura della proteina codificata. Di conseguenza, nel contesto delle sequenze di acidi nucleici, "sostanzialmente uguali" significa almeno il 65% di identità tra due o più sequenze. Preferibilmente, il termine si riferisce ad almeno il 70% di identità tra due o più sequenze, più preferibilmente almeno il 75% di identità, più preferibilmente almeno l'80% di identità, più preferibilmente almeno l'85% di identità, più preferibilmente almeno il 90% di identità, più preferibilmente almeno il 91% di identità, più preferibilmente almeno il 92% di identità, più preferibilmente almeno il 93% di identità, più preferibilmente almeno il 94% di identità, più preferibilmente almeno il 95% di identità, più preferibilmente almeno il 96% di identità, più preferibilmente almeno il 97% di identità, più preferibilmente almeno il 98% di identità e più preferibilmente almeno il 99% o maggiore di identità. L'identità percentuale tra le due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze (vale a dire, % di omologia = n . di posizioni identiche/ n totale di posizioni $\times 100$), tenendo conto del numero di spazi vuoti e della lunghezza di ciascun spazio vuoto che devono essere introdotti per

un allineamento ottimale delle due sequenze. L'identità percentuale tra due sequenze di amminoacidi o nucleotidi può essere ad es. determinata usando l'algoritmo di E. Meyers e W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988) che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0), usando una tabella dei residui di peso PAM120, una penalità di lunghezza di spazio vuoto di 12 e una penalità di spazio vuoto di 4. In aggiunta, l'identità percentuale tra due sequenze di amminoacidi può essere determinata usando l'algoritmo di Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970).

Il grado di variazione che può verificarsi all'interno della sequenza di amminoacidi di una proteina senza avere un effetto sostanziale sulla funzione della proteina è molto inferiore a quello di una sequenza di acido nucleico, dal momento che gli stessi principi di degenerazione non si applicano alle sequenze di amminoacidi. Di conseguenza, nel contesto di un anticorpo o di un frammento legante l'antigene, "sostanzialmente uguali" significa anticorpi o frammenti leganti l'antigene aventi il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità con gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene descritti. Sono anche divulgati anticorpi specifici GPRC5D, o frammenti leganti l'antigene, che hanno una cornice, un'impalcatura o altre regioni non leganti che non condividono un'identità significativa con gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto, ma incorporano una o più CDR o altre sequenze necessarie per conferire il legame che sono identiche al 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a tali sequenze descritte nel presente contesto. Un "vettore" è un replicone come plasmide, fago, cosmide o virus in cui un altro segmento di acido nucleico può essere inserito operativamente in modo da determinare la replicazione o l'espressione del segmento.

Un "clone" è una popolazione di cellule derivate da una singola cellula o da un antenato comune mediante mitosi. Una "linea cellulare" è un clone di una cellula primaria che è capace di crescita stabile in vitro per molte generazioni. In alcuni esempi forniti nel presente contesto, le cellule vengono trasformate mediante trasfezione delle cellule con il DNA.

I termini "esprimere" e "produrre" sono usati nel presente contesto come sinonimi, e si riferiscono alla biosintesi di un prodotto genico. Questi termini inglobano la trascrizione di un gene in RNA. Questi termini inglobano anche la traduzione dell'RNA in uno o più polipeptidi e inglobano inoltre tutte le modifiche post-trascrizionali e post-traduzionali presenti in natura. L'espressione o la produzione di un anticorpo o di un frammento legante l'antigene di esso può avvenire all'interno del citoplasma della cellula o nell'ambiente extracellulare, come il mezzo di crescita di una coltura cellulare.

I termini "trattare" o "trattamento" si riferiscono a qualsiasi successo o indizi di successo nell'attenuazione o nel miglioramento di una lesione, patologia o condizione, inclusi qualsiasi parametro oggettivo o soggettivo come soppressione, remissione, diminuzione dei sintomi o maggiore tollerabilità della condizione per il paziente, rallentamento della velocità di degenerazione o declino, rendendo il punto finale di degenerazione meno debilitante, miglioramento del benessere fisico o mentale di un soggetto o prolungamento della sopravvivenza. Il trattamento può essere esaminato mediante parametri oggettivi o soggettivi; inclusi i risultati di un esame fisico, di un esame neurologico o di giudizi psichiatrici.

Una "quantità efficace" o "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce a una quantità efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, per conseguire un risultato terapeutico desiderato. Una quantità terapeuticamente efficace di un

anticorpo GPRC5D x CD3 può variare secondo fattori come lo stato di malattia, età, sesso, e peso dell'individuo, e l'abilità dell'anticorpo di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. Una quantità terapeuticamente efficace è anche una in cui gli effetti tossici o dannosi dell'anticorpo o della porzione di anticorpo sono superati dagli effetti terapeuticamente di beneficio.

"Anticorpo" si riferisce a tutti gli isotipi di immunoglobuline (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD e IgY), incluse varie forme monomeriche, polimeriche e chimeriche, salvo altrimenti specificato. Il termine "anticorpo" ingloba specificamente anticorpi policlonali, anticorpi monoclonali (mAb) e i polipeptidi simili a anticorpi, come gli anticorpi chimerici e gli anticorpi umanizzati.

"Frammenti leganti l'antigene" sono qualsiasi struttura proteinacea che può presentare affinità di legame per un particolare antigene. I frammenti leganti l'antigene includono quelli forniti mediante qualsiasi tecnica nota, come la scissione enzimatica, la sintesi peptidica e le tecniche ricombinanti. Alcuni frammenti leganti l'antigene sono costituiti da porzioni di anticorpi intatti che mantengono la specificità di legame per l'antigene della molecola di anticorpo progenitore. Per esempio, i frammenti leganti l'antigene possono comprendere almeno una regione variabile (una regione variabile della catena pesante o della catena leggera) oppure una o più CDR di un anticorpo noto per legare un particolare antigene. Esempi di frammenti leganti l'antigene idonei includono, senza limitazioni, diabody e molecole a catena singola, nonché molecole Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc e Fv, anticorpi a catena singola (Sc), catene leggere di anticorpi individuali, catene pesanti di anticorpi individuali, fusioni chimeriche tra catene o CDR di anticorpi e altre proteine, impalcature proteiche, monomeri o dimeri di catene pesanti, monomeri o dimeri di catene leggere, dimeri consistenti in una

catena pesante e una leggera, un frammento monovalente consistente in domini VL, VH, CL e CH1, o un anticorpo monovalente come descritto in WO2007059782, frammenti bivalenti comprendenti due frammenti Fab collegati mediante un ponte disolfuro nella regione cerniera, un frammento Fd consistente essenzialmente in domini V.sub.H e C.sub.H1; un frammento Fv consistente essenzialmente nei domini VL e VH di un singolo braccio di un anticorpo, un frammento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), che consiste essenzialmente in un dominio VH ed è anche chiamato anticorpi di dominio (Holt et al; Trends Biotechnol. Novembre 2003; 21(11):484-90); camelidi o nanobody (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. gennaio 2005; 5(1):111-24); una regione determinante la complementarità (CDR, Complementarity Determining Region) isolata e simili. Per produrre frammenti leganti l'antigene si possono usare tutti gli isotipi di anticorpi. In modo aggiuntivo, i frammenti leganti l'antigene possono includere strutture proteinacee non anticorpali che possono incorporare con successo segmenti polipeptidici in un orientamento che conferisce affinità per un dato antigene di interesse, come le impalcature proteiche. I frammenti leganti l'antigene possono essere prodotti in modo ricombinante o prodotti mediante scissione enzimatica o chimica di anticorpi intatti. La locuzione "un anticorpo o un frammento legante l'antigene di esso" può essere usata per denotare che un dato frammento legante l'antigene incorpora uno o più segmenti di amminoacidi dell'anticorpo a cui si fa riferimento nella locuzione.

I termini "CDR" e il suo plurale "le CDR" si riferiscono a una regione determinante la complementarità (CDR), di cui tre costituiscono il carattere di legame di una regione variabile della catena leggera (CDRL1, CDRL2 e CDRL3) e tre costituiscono il carattere di legame di una regione variabile della catena

pesante (CDRH1, CDRH2 e CDRH3). Le CDR contribuiscono all'attività funzionale di una molecola di anticorpo e sono separate mediante sequenze di amminoacidi che comprendono regioni di impalcatura o cornice. I confini e le lunghezze esatte delle CDR sono soggetti a differenti sistemi di classificazione e numerazione. Le CDR possono pertanto essere definite mediante Kabat, Chothia, contatto o qualsiasi altra definizione di confine. Malgrado i confini differenti, ciascuno di questi sistemi ha un certo grado di sovrapposizione in quelle che costituiscono le cosiddette "regioni ipervariabili" all'interno delle sequenze variabili. Le definizioni di CDR secondo questi sistemi possono pertanto differire in lunghezza e aree di confine rispetto alla regione cornice adiacente. Si veda per esempio Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed. Pubblicazione NIH n. 91-3242 (1991); Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); e MacCallum et al., "Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography," *J. Mol. Biol.* 262:732 (1996)).

Tipicamente, le CDR formano una struttura ad ansa che può essere classificata come struttura canonica. L'espressione "struttura canonica" si riferisce alla conformazione della catena principale adottata dalle anse (CDR) leganti l'antigene. Da studi strutturali comparativi è stato trovato che cinque delle sei anse leganti l'antigene hanno solo un repertorio limitato di conformazioni disponibili. Ciascuna struttura canonica può essere caratterizzata mediante angoli di torsione dello scheletro polipeptidico. Le anse corrispondenti tra anticorpi possono pertanto avere strutture tridimensionali molto simili, malgrado l'elevata variabilità di sequenza di amminoacidi nella maggior parte delle parti delle anse (Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins", *J. Mol.*

Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions," I 342:877 (1989); Martin and Thornton, "Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies," J. Mol. Biol. 263:800 (1996)). Per di più, vi è una relazione tra la struttura ad ansa adottata e le sequenze di amminoacidi che la circondano. La conformazione di una particolare classe canonica è determinata dalla lunghezza dell'ansa e dai residui di amminoacidi che risiedono in corrispondenza di posizioni chiave all'interno dell'ansa, nonché all'interno della struttura conservata (vale a dire, all'esterno dell'ansa). L'assegnazione a una particolare classe canonica può pertanto essere realizzata in base alla presenza di questi residui amminoacidici chiave.

Il termine "polipeptide" è usato in modo intercambiabile con il termine "proteina" e, nel suo senso più ampio, si riferisce a un composto di due o più amminoacidi subunità, analoghi di amminoacidi o peptidomimetici. Le subunità possono essere collegate tramite legami peptidici. La subunità può essere collegata mediante altri legami, ad es. estere, etere, ecc. Come utilizzato nel presente contesto, il termine "amminoacido" si riferisce ad amminoacidi naturali e/o non naturali o sintetici, inclusi la glicina e gli isomeri ottici D e L, analoghi degli amminoacidi e peptidomimetici. Un peptide di tre o più amminoacidi è comunemente chiamato oligopeptide se la catena peptidica è corta. Se la catena peptidica è lunga, il peptide viene comunemente chiamato polipeptide o proteina.

"Si lega specificamente" o "lega specificamente" o derivati di essi, quando usati nel contesto di anticorpi o frammenti di anticorpi, rappresenta il legame tramite domini codificati da geni delle immunoglobuline o frammenti di geni delle immunoglobuline contro uno o più epitopi di una proteina di interesse, senza

legarsi preferenzialmente ad altre molecole in un campione contenente una popolazione mista di molecole. Tipicamente, un anticorpo si lega a un antigene affine con una K_d inferiore di circa 1×10^{-8} M, come misurato mediante un saggio di risonanza plasmonica di superficie o un saggio di legame cellulare. Locuzioni come anticorpo "[antigene]-specifico" (ad es., anticorpo GPRC5D-specifico) intendono trasmettere che l'anticorpo citato lega specificamente l'antigene citato.

"Polinucleotide", a cui ci si riferisce con i sinonimi come "molecola di acido nucleico", "nucleotidi" o "acidi nucleici", si riferisce a qualsiasi poliribonucleotide o polidesossiribonucleotide, che può essere RNA o DNA non modificato o RNA o DNA modificato. "Polinucleotidi" includono, senza limitazione, DNA a singolo e doppio filamento, DNA che è una miscela di regioni a singolo e doppio filamento, RNA a singolo e doppio filamento e RNA che è una miscela di regioni a singolo e doppio filamento, molecole ibride comprendenti DNA e RNA che possono essere a singolo filamento o, più tipicamente, a doppio filamento o una miscela di regioni a singolo e doppio filamento. In aggiunta, "polinucleotide" si riferisce a regioni a triplo filamento comprendenti RNA o DNA o sia RNA sia DNA. Il termine polinucleotide include anche DNA o RNA contenenti una o più basi modificate e DNA o RNA con catene principali modificate per stabilità o per altri motivi. Le basi "modificate" includono, per esempio, le basi tritilate e basi insolite come inosina. Può essere realizzata una varietà di modifiche al DNA e all'RNA; pertanto, "polinucleotide" racchiude forme di polinucleotidi modificate chimicamente, enzimaticamente o metabolicamente, come quelle che si trovano tipicamente in natura, nonché le forme chimiche di DNA e RNA caratteristiche di virus e cellule. "Polinucleotide" racchiude anche catene di acidi nucleici relativamente corte, a cui ci si riferisce spesso come oligonucleotidi.

Un "vettore" è un replicone come plasmide, fago, cosmide o virus in cui un altro segmento di acido nucleico può essere inserito operativamente in modo da determinare la replicazione o l'espressione del segmento.

Come usata nel presente contesto, l'espressione "cellula ospite" può essere qualsiasi tipo di cellula, ad es. una cellula primaria, una cellula in coltura o una cellula di una linea di cellule. L'espressione "cellula ospite" può riferirsi a una cellula trasfettata con una molecola di acido nucleico e alla progenie o potenziale progenie di tale cellula. La progenie di tale cellula può essere o non essere identica alla cellula progenitrice trasfettata con la molecola di acido nucleico, ad es. a causa di mutazioni o influenze ambientali che possono verificarsi nelle generazioni successive o dell'integrazione della molecola di acido nucleico nel genoma della cellula ospite. I termini "espressione" e "produzione", sono usati come sinonimi nel presente contesto e si riferiscono alla biosintesi di un prodotto genico. Questi termini inglobano la trascrizione di un gene in RNA. Questi termini inglobano anche la traduzione dell'RNA in uno o più polipeptidi e inglobano inoltre tutte le modifiche post-trascrizionali e post-traduzionali presenti in natura. L'espressione o la produzione di un anticorpo o di un frammento legante l'antigene di esso può avvenire all'interno del citoplasma della cellula o nell'ambiente extracellulare, come il mezzo di crescita di una coltura cellulare. Il significato di "sostanzialmente uguali" può differire a seconda del contesto in cui il termine viene usato. Poiché esiste una probabile variazione della sequenza naturale fra catene pesanti e leggere e i geni che le codificano, ci si aspetta di trovare un certo livello di variazione all'interno delle sequenze di amminoacidi o dei geni che codificano gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto, con scarso o nessun impatto sulle loro proprietà di legame uniche (ad

es., specificità e affinità). Tale aspettativa è dovuta in parte alla degenerazione del codice genetico, nonché al successo evolutivo delle variazioni conservative della sequenza di amminoacidi, che non alterano in modo apprezzabile la natura della proteina codificata. Di conseguenza, nel contesto delle sequenze di acidi nucleici, "sostanzialmente uguali" significa almeno il 65% di identità tra due o più sequenze. Preferibilmente, il termine si riferisce ad almeno il 70% di identità tra due o più sequenze, più preferibilmente almeno il 75% di identità, più preferibilmente almeno l'80% di identità, più preferibilmente almeno l'85% di identità, più preferibilmente almeno il 90% di identità, più preferibilmente almeno il 91% di identità, più preferibilmente almeno il 92% di identità, più preferibilmente almeno il 93% di identità, più preferibilmente almeno il 94% di identità, più preferibilmente almeno il 95% di identità, più preferibilmente almeno il 96% di identità, più preferibilmente almeno il 97% di identità, più preferibilmente almeno il 98% di identità e più preferibilmente almeno il 99% o maggiore di identità.

L'identità percentuale tra le due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze (vale a dire, % di omologia = n . di posizioni identiche/ n totale di posizioni $\times 100$), tenendo conto del numero di spazi vuoti e della lunghezza di ciascun spazio vuoto che devono essere introdotti per un allineamento ottimale delle due sequenze. L'identità percentuale tra due sequenze di amminoacidi o nucleotidi può essere ad es. determinata usando l'algoritmo di E. Meyers e W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0), usando una tabella dei residui di peso PAM120, una penalità di lunghezza di spazio vuoto di 12 e una penalità di spazio vuoto di 4. In aggiunta, l'identità percentuale tra due sequenze di amminoacidi può essere determinata usando l'algoritmo di Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol.

48:444-453 (1970).

Il grado di variazione che può verificarsi all'interno della sequenza di amminoacidi di una proteina senza avere un effetto sostanziale sulla funzione della proteina è molto inferiore a quello di una sequenza di acido nucleico, dal momento che gli stessi principi di degenerazione non si applicano alle sequenze di amminoacidi. Di conseguenza, nel contesto di un anticorpo o di un frammento legante l'antigene, "sostanzialmente uguali" significa anticorpi o frammenti leganti l'antigene aventi il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità con gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene descritti. Sono anche divulgati anticorpi GPRC5D-specifici, o frammenti leganti l'antigene, che hanno una cornice, un'impalcatura o altre regioni non leganti che non condividono un'identità significativa con gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto, ma incorporano una o più CDR o altre sequenze necessarie per conferire il legame che sono identiche al 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a tali sequenze descritte nel presente contesto.

Il termine "soggetto" si riferisce agli animali umani e non umani, inclusi tutti i vertebrati, ad es., mammiferi e non mammiferi, come primati non umani, topi, conigli, pecore, cani, gatti, cavalli, mucche, polli, anfibi e rettili. In molte forme di realizzazione dei metodi descritti, il soggetto è un essere umano.

Il termine "reindirizzare" o "reindirizzamento" come usato nel presente contesto si riferisce all'abilità dell'anticorpo GPRC5D x CD3 di trasferire efficacemente l'attività delle cellule T, dalla sua specificità affine naturale verso la reattività contro le cellule che esprimono GPRC5D.

Il termine "campione", come usato nel presente contesto, si riferisce a una raccolta di fluidi, cellule o tessuti simili (ad es., tessuto di tumore resecato

chirurgicamente, biopsie, incluso l'agoaspirato), isolati da un soggetto, nonché a fluidi, cellule o tessuti presenti all'interno di un soggetto. In alcune forme di realizzazione il campione è un fluido biologico. I fluidi biologici sono tipicamente liquidi a temperature fisiologiche e possono includere fluidi presenti in natura, prelevati, espressi o altrimenti estratti da un soggetto o da una fonte biologica. Certi fluidi biologici derivano da particolari tessuti, organi o regioni localizzate, e certi altri fluidi biologici possono essere situati in modo più globale o sistemico in un soggetto o in una fonte biologica. Esempi di fluidi biologici includono sangue, siero e fluidi sierosi, plasma, linfa, urina, saliva, fluido cistico, lacrime, feci, espettorato, secrezioni mucosali dei tessuti e degli organi secretori, secrezioni vaginali, fluidi ascitici come quelli associati a tumori non solidi, fluidi delle cavità pleuriche, pericardiche, peritoneali, addominali e di altre parti del corpo, fluidi raccolti mediante lavaggio bronchiale e simili. I fluidi biologici possono anche includere soluzioni liquide messe a contatto con un soggetto o una fonte biologica, per esempio terreni di coltura di cellule e organi, compresi terreni condizionati per cellule o organi, fluidi di lavaggio e simili. Il termine "campione", come usato nel presente contesto, ingloba materiali rimossi da un soggetto o materiali presenti in un soggetto.

Uno "standard noto" può essere una soluzione avente una quantità o concentrazione nota di GPRC5D, dove la soluzione può essere una soluzione presente in natura, come un campione di un paziente affetto da cancro in fase iniziale, moderata, avanzata, progressiva o statica, oppure la soluzione può essere una soluzione sintetica come acqua tamponata avente una quantità nota di GPRC5D diluita in esso. Gli standard noti, descritti nel presente contesto, possono includere GPRC5D isolato da un soggetto, proteina GPRC5D ricombinante o

purificata, oppure un valore di concentrazione di GPRC5D associato a una condizione patologica.

Come usati nel presente contesto, le espressioni "membro D del gruppo 5 della famiglia C dei recettori accoppiati alla proteina G" e "GPRC5D" includono specificamente la proteina umana GPRC5D, per esempio come descritto in GenBank n. di accesso BC069341, sequenza di riferimento NCBI: NP_061124.1 e UniProtKB/Swiss-Prot n. di accesso Q9NZD1 (si veda anche Brauner-Osborne, H. et al. 2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1518, 237-248).

Il termine "CD3" si riferisce al complesso multi-subunità della proteina CD3. Il complesso multi-subunità della proteina CD3 è composto da 6 catene polipeptidiche distintive. Queste includono una catena CD3 γ (SwissProt P09693), una catena CD3 δ (SwissProt P04234), due catene CD3 ϵ (SwissProt P07766) e un omodimero della catena CD3 ζ (SwissProt 20963), e che è associato alla catena α e β del recettore delle cellule T. Il termine "CD3" include qualsiasi variante, isoforma e omologo di specie di CD3, che è espresso naturalmente dalle cellule (incluse cellule T) o può essere espresso su cellule trasfettate con geni o cDNA codificanti quei polipeptidi, salvo notato.

Un "anticorpo GPRC5D x CD3" è un anticorpo multispecifico, facoltativamente un anticorpo bispecifico, che comprende due differenti regioni leganti l'antigene, una delle quali si lega specificamente all'antigene GPRC5D e una delle quali si lega specificamente a CD3. Un anticorpo multispecifico può essere un anticorpo bispecifico, un diabody o una molecola simile (si veda ad esempio PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) per una descrizione dei diabody). Gli anticorpi bispecifici, i diabody e simili, forniti nel presente contesto, possono legare qualsiasi bersaglio idoneo oltre a una porzione di GPRC5D. La locuzione

"anticorpo bispecifico" deve essere compresa come un anticorpo che presenta due diverse regioni leganti l'antigene definite da sequenze anticorpali differenti. Ciò può essere compreso come legame a bersagli differenti, ma include altresì il legame a epitopi differenti in un bersaglio.

Un "campione di riferimento" è un campione che può essere confrontato contro un altro campione, come un campione di prova, per consentire la caratterizzazione del campione confrontato. Il campione di riferimento ha alcune proprietà caratterizzate che servono da base per il confronto con il campione di prova. Per esempio, un campione di riferimento può essere usato come valore indicativo per i livelli di GPRC5D indicativi di un soggetto affetto da cancro. Il campione di riferimento non deve necessariamente essere analizzato parallelamente al campione di prova, dunque in alcuni casi il campione di riferimento può essere un valore o un intervallo numerico precedentemente determinato per caratterizzare una data condizione, come i livelli di GPRC5D indicativi di cancro in un soggetto. Il termine include anche campioni usati per scopi comparativi che sono noti per essere associati a uno stato fisiologico o a una condizione patologica, come il cancro che esprime GPRC5D, ma che hanno una quantità sconosciuta di GPRC5D.

Il termine "progressione", come usato nel contesto della progressione del cancro che esprime GPRC5D, include il cambiamento di un cancro da uno stato meno grave a uno più grave. Ciò può includere un aumento del numero o della gravità dei tumori, il grado di metastasi, la velocità con cui il cancro cresce o si diffonde e simili. Per esempio, "la progressione del cancro del colon" include la progressione di tale cancro da uno stato meno grave a uno più grave, come la progressione dallo stadio I allo stadio II, dallo stadio II allo stadio III, ecc.

Il termine "regressione", come usato nel contesto della regressione del cancro che esprime GPRC5D, include il cambiamento di un cancro da uno stato più grave a uno meno grave. Ciò può includere una diminuzione del numero o della gravità dei tumori, del grado di metastasi, della velocità con cui il cancro cresce o si diffonde e simili. Per esempio, "la regressione del cancro del colon" include la regressione di tale cancro da uno stato più grave a uno meno grave, come la progressione dallo stadio III allo stadio II, dallo stadio II allo stadio I, ecc.

Il termine "stabile", usato nel contesto del cancro stabile che esprime GPRC5D, intende descrivere una condizione patologica che non è, o non è cambiata, in modo sufficientemente significativo in un periodo di tempo clinicamente rilevante da essere considerata un cancro in progressione o in regressione.

La divulgazione non è limitata a particolari metodi, reagenti, composti, composizioni o sistemi biologici, che possono ovviamente variare.

Anticorpi GPRC5D-specifici e frammenti leganti l'antigene

Descritti nel presente contesto sono anticorpi ricombinanti isolati e frammenti leganti l'antigene che legano specificamente GPRC5D. La struttura generale di una molecola di anticorpo comprende un dominio legante l'antigene, che include catene pesanti e leggere, e il dominio Fc, che svolge una varietà di funzioni, inclusi la fissazione del complemento e il legame con i recettori per gli anticorpi.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici descritti o frammenti leganti l'antigene includono tutti gli isotipi, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e multimeri sintetici della struttura immunoglobulinica a quattro catene. Gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti includono anche l'isotipo IgY generalmente trovato nel siero di gallina o tacchino e nel tuorlo d'uovo di gallina o tacchino.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici e i frammenti leganti l'antigene possono essere derivati da qualsiasi specie mediante mezzi ricombinanti. Per esempio, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene possono essere di topo, ratto, capra, cavallo, maiale, bovino, pollo, coniglio, camelide, asino, umano o versioni chimeriche di essi. Per l'uso nella somministrazione agli esseri umani, gli anticorpi non derivati da esseri umani o i frammenti leganti l'antigene possono essere geneticamente o strutturalmente modificati per essere meno antigenici una volta somministrati a un paziente umano.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene sono chimerici. Come usato nel presente contesto, il termine "chimerico" si riferisce a un anticorpo, o a un frammento legante l'antigene di esso, avente almeno una porzione di almeno un dominio variabile derivato dalla sequenza di amminoacidi dell'anticorpo di un mammifero non umano, un roditore o un rettile, mentre le restanti porzioni dell'anticorpo, o del frammento legante l'antigene di esso, derivano da un essere umano.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi sono anticorpi umanizzati. Gli anticorpi umanizzati possono essere immunoglobuline chimeriche, catene di immunoglobuline o frammenti di esse (come Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ o altre sottosequenze di anticorpi leganti l'antigene) che contengono una sequenza minima derivata da immunoglobuline non umane. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui i residui di una regione determinante la complementarità (CDR) del ricevente vengono sostituiti da residui di una CDR di una specie non umana (anticorpo donatore) come topo, ratto o coniglio, aventi la specificità, l'affinità e la capacità desiderate. In generale, l'anticorpo umanizzato comprende sostanzialmente tutto

di almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le regioni CDR corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni cornice sono quelle di una sequenza di immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato può includere almeno una porzione di una regione costante (Fc) dell'immunoglobulina, tipicamente quella di un'immunoglobulina umana.

Gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto possono verificarsi in una varietà di forme, ma includono una o più delle CDR di anticorpo mostrate nella Tabella 1.

Descritti nel presente contesto sono anticorpi ricombinanti e frammenti leganti l'antigene che si legano specificamente a GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene GPRC5D-specifici sono IgG umane, o derivati di esse. Sebbene gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene GPRC5D-specifici esemplificati nel presente contesto siano umani, gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene esemplificati possono essere chimerizzati.

Gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene GPRC5D-specifici comprendono una CDR1 della catena pesante comprendente ID di SEQ n. 4, una CDR2 della catena pesante comprendente ID di SEQ n. 8, una CDR3 della catena pesante comprendente ID di SEQ n. 12, una CDR1 della catena leggera comprendente ID di SEQ n. 15, una CDR2 della catena leggera comprendente ID di SEQ n. 18 e una CDR3 della catena leggera comprendente ID di SEQ n. 21. Gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene GPRC5D-specifici comprendono un dominio variabile della catena pesante della ID di SEQ n. 55 e un dominio variabile della catena leggera di ID di SEQ n. 58. Il dominio variabile della catena pesante e dominio variabile della catena leggera di anticorpi disaminati in questo

paragrafo sono idonei per l'inclusione in costrutti bispecifici in cui il braccio è un braccio anti-GPRC5D.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene sono IgG o derivati di esse, ad es., isotipi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In alcune forme di realizzazione in cui l'anticorpo è di isotipo IgG1, l'anticorpo comprende una regione Fc di IgG1 (ID di SEQ n. 60).

ID di SEQ n. 60

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

In alcune forme di realizzazione in cui l'anticorpo ha un isotipo IgG4, l'anticorpo contiene le sostituzioni S228P, L234A e L235A nella sua regione Fc (ID di SEQ n. 59).

ID di SEQ n. 59

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Gli anticorpi specifici definiti da CDR e/o sequenza di dominio variabile disaminati nei paragrafi sopra possono includere queste modifiche.

Sono stati anche divulgati polinucleotidi isolati che codificano gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene che si legano immunospecificamente a GPRC5D. I polinucleotidi isolati capaci di codificare i segmenti di domini variabili forniti nel presente contesto possono essere inclusi sugli stessi, o differenti, vettori per

produrre anticorpi o frammenti leganti l'antigene. Di seguito è mostrata una sequenza di polinucleotidi esemplificativa che codifica un anticorpo GPRC5D:

La sequenza di catena pesante è (ID di SEQ n. 96):

```
atggcctgggtctggaccctgctgttctgatggccgtgcccagagcatccaggccaggtgcagctggcgagagcggcg
ccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagcttcacgggctacaccatgaactgggtgcg
gcaggcccccgccaggcgctggagtggtggcctgatcaaccctacaacagcgacaccaactacgcccagaagctgcagggccg
ggtgaccatgaccaccgacaccagcaccagcaccgcctacatggagctgaggagcctgaggagcagacaccgctgtactactgc
gcccgggtggccctgagggtggccctggactactggggccaggggcacctggtgaccgtgagcagcgctccaccaaggggccatcc
gtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtg
acggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctccgggctgtcctacagtcctcaggacttactcctcagcagcg
tggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaga
gttgagtccaaatattggtcccccattgcccaccatgcccagcacctgaggccgcccggggaccatcagtcttctgttcccccaaaacca
aggacactctcatgtatctccggaccccctgaggtcacgtgctgtggtggagcgtgagccagggaagaccccaggtccagttaactggt
acgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
gtcctgcaccaggaactgggtgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctgtgtaaaaggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcc
cgtgctggactccgagcgtcttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga
```

La sequenza di catena leggera è (ID di SEQ n. 90):

```
atgggggtgctggcccagctgctgggactgctgctgctgcttccctggcgccagatgcgacatccagatgacccagagccccagcagc
ctgagcgccagcgtggcgaccgggtgacctcacctgcaaggccagccagaacgtggccaccacgtgggctggtaccagcagaag
cccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcgccagctaccggtacagcggcgtgcccagccgggttcagcggcagcggcagcggc
accgagttcacccctgacctcagcaacctgcagcccaggagcttgcacacctactactgcccagcagtacaaccgggtacccctacaccttgc
gccagggcaccaagctggagatcaagcgtacggtggctgacctatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaact
gcctctgtgtgtgcctgctgaataattctatccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcca
ggagaggtgtcacagcagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggtga
```

Vengono anche divulgati polinucleotidi che codificano proteine leganti l'antigene ricombinanti. I polinucleotidi descritti (e i peptidi che codificano) possono includere una sequenza leader. Può essere impiegata qualsiasi sequenza leader nota nell'arte. La sequenza leader può includere, ma non è limitata a, un sito di restrizione o un sito di inizio della traduzione.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto includono varianti aventi singole o molteplici sostituzioni, delezioni, o addizioni di amminoacidi che ritengono le proprietà biologiche (ad es. affinità di legame o attività effettrice immunitaria) degli anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti. Nel contesto della presente invenzione, salvo altrimenti indicato, per descrivere una mutazione vengono usate le seguenti notazioni: i) la sostituzione di un amminoacido in una data posizione è scritta ad es. come S228P, che significa una sostituzione di una serina in posizione 228 con una prolina; e ii) per varianti specifiche vengono usati i codici specifici a tre o una lettera, inclusi i codici Xaa e X per indicare qualsiasi residuo di amminoacido. Dunque, la sostituzione della serina all'arginina in posizione 228 è designata come: S228P, o la sostituzione di qualsiasi residuo di amminoacido alla serina in posizione 228 è designata come S228P. In caso di delezione di serina in posizione 228 è indicata da K228*. L'esperto può produrre varianti aventi sostituzioni, delezioni, o addizioni di amminoacidi singole o multiple.

Queste varianti possono includere: (a) varianti in cui uno o più residui di amminoacidi sono sostituiti con amminoacidi conservativi o non conservativi, (b) varianti in cui uno o più amminoacidi sono addizionati a o deleti dal polipeptide, (c) varianti in cui uno o più amminoacidi includono un gruppo sostituyente, e (d) varianti in cui il polipeptide è fuso a un altro peptide o polipeptide come un partner di fusione, un tag di proteina o altro raggruppamento chimico, che può conferire proprietà utili al polipeptide, come, per esempio, un epitopo per un anticorpo, una sequenza di poliistidina, un raggruppamento di biotina e simili. Anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto possono includere varianti in cui residui di amminoacidi da una specie sono sostituiti al residuo

corrispondente in un'altra specie, in corrispondenza delle posizioni conservata o non conservata. Residui di amminoacidi in corrispondenza di posizioni non conservate possono essere sostituiti con residui conservativi o non conservativi. Le tecniche per ottenere queste varianti, incluse tecniche genetiche (delezioni, mutazioni, ecc.), chimiche, ed enzimatiche, sono note agli esperti dell'arte.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici o i frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto possono incorporare svariati isotipi di anticorpi, come IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. In alcune forme di realizzazione l'isotipo dell'anticorpo è l'isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferibilmente l'isotipo IgG1 o IgG4. La specificità dell'anticorpo o frammento legante l'antigene di esso è determinata in gran parte mediante la sequenza e sistemazione delle CDR. Pertanto, le CDR di un isotipo possono essere trasferite a un altro isotipo senza alterare la specificità dell'antigene. In alternativa, sono state stabilite tecniche per provocare la commutazione di ibridomi dalla produzione di un isotipo di anticorpo a un altro (cambio di isotipo) senza alterare la specificità per l'antigene. Di conseguenza, tali isotipi di anticorpo rientrano nell'ambito degli anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti.

Forniti sono anche vettori comprendenti i polinucleotidi descritti nel presente contesto. I vettori possono essere vettori di espressione. Vengono dunque divulgati vettori di espressione ricombinanti contenenti una sequenza che codifica un polipeptide di interesse. Il vettore di espressione può contenere una o più sequenze aggiuntive come ma non limitate a sequenze regolatrici (ad es. promotore, potenziatore), un marcatore di selezione, e un segnale di poliadenilazione. I vettori per trasformare un'ampia varietà di cellule ospiti sono ben noti e includono, ma non sono limitati a, plasmidi, fagemidi, cosmidi,

baculovirus, bacmidi, cromosomi batterici artificiali (BAC, Bacterial Artificial Chromosome), cromosomi artificiali di lievito (YAC, Yeast Artificial Chromosome), come anche altri vettori batterici, di lievito e virali.

I vettori di espressione ricombinanti divulgati includono frammenti di acido nucleico sintetici, genomici o derivati da cDNA che codificano almeno una proteina ricombinante che può essere operativamente collegata a elementi regolatori idonei. Tali elementi regolatori possono includere un promotore trascrizionale, sequenze codificanti siti di legame ribosomiale di mRNA idonei, e sequenze che controllano la terminazione di trascrizione e traduzione. I vettori di espressione, specialmente vettori di espressione di mammifero, possono anche includere uno o più elementi non trascritti come un'origine di replicazione, un promotore e potenziatore idonei collegati al gene da esprimere, altre sequenze non trascritte fiancheggianti in 5' o 3', sequenze non tradotte in 5' o 3' (come siti di legame di ribosoma necessari), un sito di poliadenilazione, siti donatori e accettori di splicing, o sequenze di terminazione trascrizionale. Può anche essere incorporata un'origine di replicazione che conferisce l'abilità di replicarsi in un ospite.

Le sequenze di controllo trascrizionale e traduzionale in vettori di espressione da usare nella trasformazione di cellule di vertebrato possono essere fornite da fonti virali. Vettori esemplificativi possono essere costruiti come descritto da Okayama e Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

In alcune forme di realizzazione, la sequenza codificante l'anticorpo o frammento legante l'antigene è posta sotto il controllo di un potente promotore costitutivo, come i promotori per i seguenti geni: ipoxantina fosforibosil transferasi (HPRT), adenosina deaminasi, piruvato chinasi, beta-actina, miosina umana, emoglobina umana, creatina dei muscoli umana, e altri. In aggiunta, molti

promotori virali funzionano in modo costitutivo nelle cellule eucariotiche e sono idonei per l'uso con le forme di realizzazione descritte. Tali promotori virali includono senza limitazione il promotore precoce immediato del citomegalovirus (CMV), i promotori precoce e tardivo di SV40, il promotore del virus del tumore mammario del topo (MMTV, Mouse Mammary Tumor Virus), le ripetizioni terminali lunghe (LTR, Long Terminal Repeat) del virus della leucemia di Maloney, virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus), virus di Epstein-Barr (EBV, Epstein Barr Virus), virus del sarcoma di Rous (RSV, Rous Sarcoma Virus), e altri retrovirus, e il promotore di timidina chinasi del virus dell'Herpes simplex. In una forma di realizzazione, la sequenza codificante l'anticorpo GPRC5D-specifico o frammento legante l'antigene di esso è posta sotto il controllo di un promotore inducibile come il promotore della metallotioneina, promotore tetraciclina-inducibile, promotore doxiciclina-inducibile, promotori che contengono uno o più elementi di risposta stimolati da interferone (ISRE, Interferon-Stimulated Response Element) come la protein chinasi R 2',5'-oligoadenilato sintetasi, geni Mx, ADAR1, e simili.

I vettori descritti nel presente contesto possono contenere uno o più sito/i interno/i di entrata del ribosoma (IRES, Internal Ribosome Entry Site). L'inclusione di una sequenza IRES in vettori di fusione può essere di beneficio per potenziare l'espressione di alcune proteine. In alcune forme di realizzazione il sistema di vettore include uno o più siti di poliadenilazione (ad es. SV40), che possono essere a monte o a valle di qualsiasi delle sequenze di acido nucleico summenzionate. I componenti di vettore possono essere collegati in modo contiguo, o sistemati in una maniera che fornisce una spaziatura ottimale per esprimere i prodotti di geni (cioè mediante l'introduzione di nucleotidi "spaziatori" tra le ORF), o posizionati in un altro

modo. Anche gli elementi regolatori, come il motivo IRES, possono essere sistemati per fornire una spaziatura ottimale per l'espressione.

I vettori possono comprendere marcatori di selezione, che sono ben noti nell'arte. I marcatori di selezione includono marcatori di selezione positivi e negativi, per esempio, geni di antibiotico-resistenza (ad es. gene di resistenza alla neomicina, un gene di resistenza alla igromicina, un gene di resistenza alla kanamicina, un gene di resistenza alla tetraciclina, un gene di resistenza alla penicillina, un gene di resistenza alla puromicina, un gene di resistenza alla blasticidina), geni di glutammato sintasi, HSV-TK, derivati di HSV-TK per selezione con ganciclovir, o gene di purina nucleoside fosforilasi batterica per la selezione con 6-metilpurina (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Una sequenza di acido nucleico codificante un marcatore di selezione o il sito di clonazione può essere a monte o a valle di una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide di interesse o sito di clonazione.

I vettori descritti nel presente contesto possono essere usati per trasformare varie cellule con i geni codificanti gli anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti. Per esempio, i vettori possono essere usati per generare anticorpi GPRC5D-specifici o cellule che producono frammenti leganti l'antigene. Dunque, un altro aspetto caratterizza le cellule ospiti trasformate con vettori comprendenti una sequenza di acidi nucleici che codifica un anticorpo o un frammento legante l'antigene di esso dell'invenzione che lega specificamente GPRC5D.

Numerose tecniche sono note nell'arte per l'introduzione di geni estranei nelle cellule e possono essere usate per costruire le cellule ricombinanti per gli scopi di attuare i metodi descritti, conformemente alle varie forme di realizzazione descritte ed esemplificate nel presente contesto. La tecnica usata deve fornire il

trasferimento stabile della sequenza di gene eterologa alla cellula ospite, in modo tale che la sequenza di gene eterologa sia ereditabile ed esprimibile dalla progenie di cellule, e così che lo sviluppo e funzioni fisiologiche necessarie delle cellule riceventi non siano interrotti. Tecniche che possono essere usate includono ma non sono limitate a trasferimento di cromosoma (ad es. fusione di cellule, trasferimento di geni mediato da cromosoma, trasferimento di geni mediato da microcellule), metodi fisici (ad es. trasfezione, fusione di sferoplasti, microiniezione, elettroporazione, veicolante di liposoma), trasferimento di vettori virali (ad es. virus a DNA ricombinante, virus a RNA ricombinante) e simili (descritti in Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). Anche precipitazione con fosfato di calcio e fusione indotta da polietilenglicole (PEG) di protoplasti batterici con cellule di mammifero possono essere usate per trasformare le cellule.

Cellule idonee per l'uso nell'espressione degli anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto sono preferibilmente cellule eucariotiche, più preferibilmente cellule di pianta, roditore, o di origine umana, per esempio ma non limitate a cellule NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293, cellule COS-7, T98G, CV-1/EBNA, cellule L, C127, 3T3, HeLa, NS1, cellule di mieloma Sp2/0, e linee di cellule BHK, fra le altre cose. In aggiunta, l'espressione di anticorpi può essere compiuta usando cellule di ibridoma. Metodi per produrre ibridomi sono ben consolidati nell'arte.

Cellule trasformate con vettori di espressione descritti nel presente contesto possono essere selezionate o sottoposte a screening per l'espressione ricombinante degli anticorpi o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto. Cellule ricombinanti positive sono espanse e sottoposte a screening per sottoclone esibenti un fenotipo desiderato, come un'espressione di alto livello,

proprietà di crescita potenziate, o l'abilità di rendere proteine con caratteristiche biochimiche desiderate, per esempio per via di modifiche di proteine o modifiche post-traduzionali alterate. Questi fenotipi possono essere dovuti a proprietà intrinseche di un dato sottoclone o a mutazione. Le mutazioni possono essere provocate attraverso l'uso di sostanze chimiche, luce a lunghezza d'onda UV, radiazione, virus, mutageni inserzionali, inibizione della riparazione di appaiamenti errati del DNA, o una combinazione di tali metodi.

Metodi di uso di anticorpi GPRC5D-specifici per il trattamento

Nel presente contesto sono forniti anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene di essi per l'uso in terapia. In particolare, questi anticorpi o frammenti leganti l'antigene possono essere utili nel trattamento del cancro, come il cancro che esprime GPRC5D. Di conseguenza, l'invenzione fornisce un metodo di trattamento del cancro che comprende la somministrazione di un anticorpo come descritto nel presente contesto, come anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene. Per esempio, l'uso può avvenire interferendo con le interazioni GPRC5D-recettore oppure dove l'anticorpo è coniugato a una tossina, in modo da mirare la tossina verso il cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include il linfoma, come il mieloma multiplo (MM). Gli anticorpi per l'uso in questi metodi includono quelli descritti nel presente contesto sopra, per esempio un anticorpo GPRC5D-specifico o un frammento legante l'antigene con le peculiarità indicate nella Tabella 1, per esempio le CDR o le sequenze di dominio variabile, e nell'ulteriore disamina di questi anticorpi.

In alcune forme di realizzazione descritte nel presente contesto, le proprietà effettrici immunitarie degli anticorpi GPRC5D-specifici possono essere

potenziate o silenziate attraverso modifiche di Fc mediante tecniche note agli esperti dell'arte. Per esempio, funzioni effettrici di Fc come legare Clq, la citotossicità complemento dipendente (CDC), citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), fagocitosi cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCP), regolazione negativa di recettori di superficie di cellula (ad es. recettore di cellule B; BCR), ecc. possono essere fornite e controllate modificando i residui nell'Fc responsabili per queste attività.

"Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente" o "ADCC" si riferisce a una reazione cellulo-mediata in cui cellule citotossiche aspecifiche che esprimono recettori di Fc (FcR) (ad es. cellule Natural Killer (NK), neutrofili, e macrofagi) riconoscono l'anticorpo legato su una cellula bersaglio e susseguentemente causano la lisi della cellula bersaglio.

L'abilità di anticorpi monoclonali di indurre ADCC può essere potenziata ingegnerizzando il loro componente oligosaccaridico. IgG1 o IgG3 umane sono N-glicosilate a livello di Asn297, con la maggior parte dei glicani nelle ben note forme biantennarie G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. Anticorpi prodotti da cellule CHO non ingegnerizzate hanno tipicamente un contenuto di glicanfucosio almeno di circa l'85%. La rimozione del nucleo fucosio dagli oligosaccaridi di tipo complesso biantennario attaccati alle regioni Fc aumenta l'ADCC degli anticorpi tramite un legame migliorato Fc.gamma.RIIIa senza alterare il legame all'antigene o l'attività CDC. Tali mAb possono essere conseguiti usando metodi differenti riportati per guidare l'espressione di successo di anticorpi defucosilati relativamente elevati che portano il tipo di complesso biantennario di oligosaccaridi Fc come il controllo dell'osmolalità della coltura (Konno et al., Cytotechnology 64:249-65, 2012), l'applicazione di una linea CHO variante Lec13 come linea di cellule ospite (Shields

et al., J Biol Chem 277:26733-26740, 2002), l'applicazione di una linea CHO variante EB66 come linea di cellule ospite (Olivier et al., MAbs; 2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582), l'applicazione di una linea di cellule ibridoma di ratto YB2/0 come linea di cellule ospite (Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), introduzione di piccoli RNA interferenti specificamente contro la α -1,6-fucosiltrasferasi (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004), o coespressione di β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasi III e α -mannosidasi II del Golgi o un potente inibitore dell' α -mannosidasi I, la kifunensina (Ferrara et al., J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

In alcune forme di realizzazione descritte nel presente contesto, l'ADCC suscitata dagli anticorpi GPRC5D può anche essere potenziata mediante certe sostituzioni nell'Fc dell'anticorpo. Sostituzioni esemplificative sono per esempio sostituzioni in corrispondenza di posizioni di amminoacidi 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 (numerazione dei residui secondo l'indice UE) come descritto nel brevetto U.S. n. 6.737.056.

Metodi di rilevamento di GPRC5D

Nel presente contesto vengono forniti metodi per rilevare GPRC5D in un campione biologico mediante contatto del campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, dell'invenzione. Come descritto nel presente contesto, il campione può essere derivato da urina, sangue, siero, plasma, saliva, ascite, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti, cellule che non sono associate a tessuto (*vale a dire*, cellule libere), tessuti (*ad es.* tessuto di tumore resecato chirurgicamente, biopsie, incluso agoaspirato), preparazioni istologiche, e simili. I metodi descritti includono il rilevamento di GPRC5D in un campione biologico

mediante il contatto del campione con uno qualsiasi degli anticorpi GPRC5D-specifici o dei frammenti leganti l'antigene di esso descritti nel presente contesto.

Il campione può essere a contatto con più di uno degli anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene descritti nel presente contesto. Per esempio, un campione può essere messo a contatto con un primo anticorpo GPRC5D-specifico, o con un frammento legante l'antigene di esso, e poi messo a contatto con un secondo anticorpo GPRC5D-specifico, o con un frammento legante l'antigene di esso, in cui il primo anticorpo o frammento legante l'antigene e il secondo anticorpo o frammento legante l'antigene non sono lo stesso anticorpo o frammento legante l'antigene. Il primo anticorpo, o il frammento legante l'antigene di esso, può essere fissato su una superficie, come una piastra multipozzetto, un chip o un substrato simile, prima del contatto con il campione. Il primo anticorpo, o il frammento legante l'antigene di esso, non può essere fissato o attaccato ad alcunché prima del contatto con il campione.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici descritti e i frammenti leganti l'antigene possono essere tracciati in modo rilevabile. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi tracciati e i frammenti leganti l'antigene possono facilitare il rilevamento di GPRC5D tramite i metodi descritti nel presente contesto. Molti di questi traccianti sono facilmente noti agli esperti dell'arte. Per esempio, i traccianti idonei includono, ma non devono essere considerati limitati a, radiotraccianti, traccianti fluorescenti, tag epitopi, biotina, traccianti cromofori, traccianti ECL o enzimi. Più specificamente, le tracciature descritte includono rutenio, ^{111}In -DOTA, acido ^{111}In -dietilentriamminopentaacetico (DTPA), perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina e beta-galattosidasi, poliistidina (HIS tag), tinture di acridina, tinture di cianina, tinture di fluorone, tinture di ossazina, tinture di fenantridina, tinture di rodamina,

tinture Alexafluor®, e simili.

Gli anticorpi GPRC5D-specifici e i frammenti leganti l'antigene descritti possono essere usati in una varietà di saggi per rilevare GPRC5D in un campione biologico. Alcuni saggi idonei includono, ma non devono essere considerati limitati a, analisi Western blot, dosaggio radioimmunologico, risonanza plasmonica di superficie, immunofluorimetria, immunoprecipitazione, dialisi all'equilibrio, immunodiffusione, dosaggio immunologico in elettrochemiluminescenza (ECL, ElectroChemiLuminescence), immunoistochimica, smistamento di cellule attivato da fluorescenza (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting) o saggio ELISA.

In alcune forme di realizzazione, il rilevamento delle cellule di cancro che esprimono GPRC5D in un soggetto può essere usato per determinare che il soggetto può essere trattato con un agente terapeutico diretto contro GPRC5D.

Il GPRC5D è presente a livelli rilevabili nei campioni di sangue e siero. Dunque, nel presente contesto vengono forniti metodi per rilevare GPRC5D in un campione derivato dal sangue, come un campione di siero, mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. Il campione di sangue, o un derivato di esso, può essere diluito, sottoposto a distillazione frazionata o altrimenti processato per rendere un campione su cui può essere svolto il metodo descritto. In alcune forme di realizzazione, GPRC5D può essere rilevato in un campione di sangue, o in un derivato di esso, mediante qualsiasi numero di saggi noti nell'arte, come, ma non limitati a, analisi Western blot, dosaggio radioimmunologico, risonanza plasmonica di superficie, immunofluorimetria, immunoprecipitazione, dialisi all'equilibrio, immunodiffusione, dosaggio immunologico in elettrochemiluminescenza (ECL), immunoistochimica, smistamento cellulare attivato dalla fluorescenza (FACS) o

saggio ELISA.

Metodi per la diagnosi del cancro

Nel presente contesto vengono forniti metodi per diagnosticare il cancro che esprime GPRC5D in un soggetto. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include i linfomi, come il mieloma multiplo (MM). In alcune forme di realizzazione, come descritto sopra, il rilevamento di GPRC5D in un campione biologico, come un campione di sangue o un campione di siero, fornisce l'abilità di diagnosticare il cancro nel soggetto da cui è stato ottenuto il campione. In alternativa, in alcune forme di realizzazione, possono essere usati anche altri campioni, come un campione istologico, un campione agoaspirato, tessuto di tumore resecato, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti e simili, per valutare se il soggetto da cui è stato ottenuto il campione ha il cancro. In alcune forme di realizzazione, può essere già noto che il soggetto da cui è stato ottenuto il campione ha il cancro, ma il tipo di cancro che affligge il soggetto può non essere ancora stato diagnosticato o una diagnosi preliminare può non essere chiara, dunque il rilevamento di GPRC5D in un campione biologico ottenuto dal soggetto può consentire o chiarire la diagnosi del cancro. Per esempio, può essere noto che un soggetto ha il cancro, ma può non essere noto o non essere chiaro se il cancro del soggetto esprime GPRC5D.

In alcune forme di realizzazione i metodi descritti implicano valutare se un soggetto è affetto da cancro che esprime GPRC5D determinando la quantità di GPRC5D presente in un campione biologico derivato dal soggetto; e confrontare la quantità osservata di GPRC5D con la quantità di GPRC5D in un campione di controllo o di riferimento, in cui una differenza tra la quantità di GPRC5D nel campione derivato dal soggetto e la quantità di GPRC5D nel campione di controllo

o di riferimento è un'indicazione che il soggetto è affetto da un cancro che esprime GPRC5D. In un'altra forma di realizzazione, la quantità di GPRC5D osservata in un campione biologico ottenuto da un soggetto può essere confrontata con i livelli di GPRC5D noti per essere associati a determinate forme o stadi di cancro, per determinare la forma o lo stadio del cancro del soggetto. In alcune forme di realizzazione, la quantità di GPRC5D nel campione derivato dal soggetto viene esaminata mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che si lega immunospecificamente a GPRC5D, come gli anticorpi GPRC5D-specifici descritti nel presente contesto. Il campione esaminato per la presenza di GPRC5D può essere derivato da urina, sangue, siero, plasma, saliva, ascite, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti, cellule che non sono associate a tessuto (*cioè*, cellule libere), tessuti (*ad es.*, tessuto di tumore resecato chirurgicamente, biopsie, incluso agoaspirato), preparati istologici, e simili. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include cancro ematologico, come il mieloma multiplo (MM). In alcune forme di realizzazione il soggetto è un essere umano.

In alcune forme di realizzazione, il metodo di diagnosi di un cancro che esprime GPRC5D implica: il contatto di un campione biologico di un soggetto con un anticorpo GPRC5D-specifico o un frammento legante l'antigene di esso (come quelli derivabili dagli anticorpi e dai frammenti forniti nella Tabella 1), la quantificazione della quantità di GPRC5D presente nel campione che è legata dall'anticorpo o frammento legante l'antigene di esso, il confronto della quantità di GPRC5D presente nel campione con un campione standard o di riferimento noto; e determinare se i livelli di GPRC5D del soggetto rientrano nei livelli di GPRC5D associati al cancro. In una forma di realizzazione aggiuntiva, il metodo diagnostico

può essere seguito da una fase aggiuntiva di somministrazione o prescrizione di un trattamento specifico per il cancro. In un'altra forma di realizzazione, il metodo diagnostico può essere seguito da una fase aggiuntiva di trasmissione dei risultati della determinazione per facilitare il trattamento del cancro. In alcune forme di realizzazione, il trattamento specifico per il cancro può essere diretto contro cancri che esprimono GPRC5D, come gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 descritti nel presente contesto.

In alcune forme di realizzazione i metodi descritti implicano valutare se un soggetto è affetto da cancro che esprime GPRC5D determinando la quantità di GPRC5D presente in un campione di sangue o di siero ottenuto dal soggetto; e confrontare la quantità osservata di GPRC5D con la quantità di GPRC5D in un campione di controllo o di riferimento, in cui una differenza tra la quantità di GPRC5D nel campione derivato dal soggetto e la quantità di GPRC5D nel campione di controllo o di riferimento è un'indicazione che il soggetto è affetto da un cancro che esprime GPRC5D.

In alcune forme di realizzazione, il campione di controllo o di riferimento può essere derivato da un soggetto non affetto da cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il campione di controllo o di riferimento può essere derivato da un soggetto affetto da cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione in cui il campione di controllo o di riferimento è derivato da un soggetto non affetto da cancro che esprime GPRC5D, un aumento osservato nella quantità di GPRC5D presente nel campione di prova, in relazione a quello osservato per il campione di controllo o di riferimento, è un'indicazione che il soggetto esaminato è affetto da cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione in cui il campione di controllo è derivato da un soggetto non affetto

da cancro che esprime GPRC5D, una diminuzione o una similarità osservata nella quantità di GPRC5D presente nel campione di prova, in relazione a quella osservata per il campione di controllo o di riferimento, è un'indicazione che il soggetto esaminato non è affetto da cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione in cui il campione di controllo o di riferimento è derivato da un soggetto affetto da cancro che esprime GPRC5D, una similarità osservata nella quantità di GPRC5D presente nel campione di prova, in relazione a quella osservata per il campione di controllo o di riferimento, è un'indicazione che il soggetto esaminato è affetto da cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione in cui il campione di controllo o di riferimento è derivato da un soggetto affetto da cancro che esprime GPRC5D, una diminuzione osservata nella quantità di GPRC5D presente nel campione di prova, in relazione a quella osservata per il campione di controllo o di riferimento, è un'indicazione che il soggetto esaminato non è affetto da cancro che esprime GPRC5D.

In alcune forme di realizzazione, la quantità di GPRC5D nel campione derivato dal soggetto viene esaminata mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D, come gli anticorpi descritti nel presente contesto. Il campione esaminato per la presenza di GPRC5D può essere derivato da urina, sangue, siero, plasma, saliva, ascite, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti, cellule che non sono associate a tessuto (*vale a dire*, cellule libere), tessuti (*ad es.*, tessuto di tumore resecato chirurgicamente, biopsie, incluso agoaspirato), preparati istologici, e simili.

In vari aspetti, la quantità di GPRC5D viene determinata mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il campione

può essere a contatto con più di un tipo di anticorpo, o frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il campione può venire a contatto con un primo anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D e quindi venire a contatto con un secondo anticorpo, o con un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. Gli anticorpi GPRC5D-specifici o frammenti leganti l'antigene come quelli descritti nel presente contesto possono essere usati in questo ruolo.

Possono essere usate varie combinazioni di anticorpi GPRC5D-specifici e frammenti leganti l'antigene per fornire un "primo" e un "secondo" anticorpo o frammento legante l'antigene per compiere i metodi diagnostici descritti. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include i linfomi, come il mieloma multiplo (MM).

In certe forme di realizzazione, la quantità di GPRC5D è determinata mediante analisi Western blot, dosaggio radioimmunologico, immunofluorimetria, immunoprecipitazione, dialisi all'equilibrio, immunodiffusione, dosaggio immunologico in elettrochemiluminescenza (ECL), immunoistochimica, smistamento cellulare attivato dalla fluorescenza (FACS) o saggio ELISA.

In varie forme di realizzazione dei metodi diagnostici descritti viene usato un campione di controllo o di riferimento. Questo campione può essere un controllo positivo o negativo del saggio che garantisce il corretto impiego del saggio usato; per esempio, un controllo di saggio di questa natura può essere comunemente usato per saggi di immunoistochimica. In alternativa, il campione può essere un riferimento standardizzato per la quantità di GPRC5D in un campione biologico di un soggetto sano. In alcune forme di realizzazione, i livelli di GPRC5D osservati nel

soggetto sottoposto a prova possono essere confrontati con i livelli di GPRC5D osservati nei campioni di soggetti noti per avere un cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il soggetto di controllo può essere affetto da un particolare cancro di interesse. In alcune forme di realizzazione, è noto che il soggetto di controllo ha un cancro in stadio iniziale, che può o può non esprimere GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, è noto che il soggetto di controllo ha un cancro in stadio intermedio, che può o può non esprimere GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, è noto che il soggetto di controllo è affetto da un cancro in stadio avanzato, che può o può non esprimere GPRC5D.

Metodi per monitorare il cancro

Nel presente contesto vengono forniti metodi per monitorare il cancro che esprime GPRC5D in un soggetto. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include i linfomi, come il mieloma multiplo (MM). In alcune forme di realizzazione, i metodi descritti implicano valutare se il cancro che esprime GPRC5D sta progredendo, regredendo o rimanendo stabile, determinando la quantità di GPRC5D presente in un campione di prova derivato dal soggetto; e confrontare la quantità osservata di GPRC5D con la quantità di GPRC5D in un campione biologico ottenuto, in modo simile, dal soggetto in un momento precedente, in cui una differenza tra la quantità di GPRC5D nel campione di prova e nel campione precedente fornisce un'indicazione se il cancro sta progredendo, regredendo o rimanendo stabile. A questo proposito, un campione di prova con una quantità aumentata di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata nel campione precedente, può indicare la progressione di un cancro che esprime GPRC5D. Al contrario, un campione di prova con una quantità ridotta di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata per il campione

precedente, può indicare la regressione di un cancro che esprime GPRC5D.

Di conseguenza, un campione di prova con una differenza insignificante nella quantità di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata per il campione precedente, può indicare uno stato di malattia stabile per un cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, la quantità di GPRC5D in un campione biologico derivato dal soggetto viene esaminata mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento di anticorpo di esso, che lega specificamente GPRC5D, come gli anticorpi descritti nel presente contesto. Il campione esaminato per la presenza di GPRC5D può essere derivato da urina, sangue, siero, plasma, saliva, ascite, cellule circolanti, cellule di tumore circolanti, cellule che non sono associate a tessuto (vale a dire cellule libere), tessuti (ad es. tessuto di tumore resecato chirurgicamente, biopsie, incluso agoaspirato), preparati istologici, e simili. In alcune forme di realizzazione il soggetto è un essere umano.

In alcune forme di realizzazione, i metodi di monitoraggio di un cancro che esprime GPRC5D implicano: il contatto di un campione biologico di un soggetto con un anticorpo GPRC5D-specifico o con un frammento legante l'antigene di esso (come quelli derivabili dagli anticorpi e dai frammenti forniti nella Tabella 1), la quantificazione della quantità di GPRC5D presente nel campione, il confronto della quantità di GPRC5D presente nel campione con la quantità di GPRC5D determinata essere presente in un campione biologico ottenuto, in modo simile, dallo stesso soggetto in un momento precedente; e determinare se il livello di GPRC5D del soggetto è cambiato nel tempo. Un campione di prova con una quantità aumentata di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata nel campione precedente, può indicare la progressione del cancro. Al contrario, un campione di prova con una quantità ridotta di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata per

il campione precedente, può indicare la regressione di un cancro che esprime GPRC5D. Di conseguenza, un campione di prova con una differenza insignificante nella quantità di GPRC5D, in relazione alla quantità osservata per il campione precedente, può indicare uno stato di malattia stabile per un cancro che esprime GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, i livelli di GPRC5D del campione possono essere confrontati con uno standard noto o con un campione di riferimento, da soli o in aggiunta ai livelli di GPRC5D osservati per un campione esaminato in un momento precedente. In una forma di realizzazione aggiuntiva, il metodo diagnostico può essere seguito da una fase aggiuntiva di somministrazione di un trattamento specifico per il cancro. In alcune forme di realizzazione, il trattamento specifico per il cancro può essere diretto contro i cancri che esprimono GPRC5D.

In vari aspetti, la quantità di GPRC5D viene determinata mettendo a contatto il campione con un anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il campione può essere a contatto con più di un tipo di anticorpo, o frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. In alcune forme di realizzazione, il campione può venire a contatto con un primo anticorpo, o un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D e quindi venire a contatto con un secondo anticorpo, o con un frammento legante l'antigene di esso, che lega specificamente GPRC5D. Gli anticorpi come quelli descritti nel presente contesto possono essere usati in questo ruolo.

Possono essere usate varie combinazioni di anticorpi e frammenti leganti l'antigene descritti nella Tabella 1 per fornire un "primo" e un "secondo" anticorpo o frammento legante l'antigene per compiere i metodi di monitoraggio descritti. In

alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D include un cancro ematologico, come il mieloma multiplo (MM).

In certe forme di realizzazione, la quantità di GPRC5D è determinata mediante analisi Western blot, dosaggio radioimmunologico, immunofluorimetria, immunoprecipitazione, dialisi all'equilibrio, immunodiffusione, dosaggio immunologico in elettrochemiluminescenza (ECL), immunoistochimica, smistamento cellulare attivato dalla fluorescenza (FACS) o saggio ELISA.

Kit per il rilevamento di GPRC5D

Nel presente contesto vengono forniti kit per rilevare GPRC5D in un campione biologico. Questi kit includono uno o più anticorpi GPRC5D-specifici descritti nel presente contesto, o un frammento legante l'antigene di esso, e le istruzioni per l'uso del kit.

L'anticorpo GPRC5D-specifico fornito, o frammento legante l'antigene, può essere in soluzione; liofilizzato; fissato su un substrato, supporto o piastra; o marcato in modo rilevabile.

I kit descritti possono anche includere componenti aggiuntivi utili per svolgere i metodi descritti nel presente contesto. A titolo di esempio, i kit possono comprendere mezzi per ottenere un campione da un soggetto, un campione di controllo o di riferimento, *ad es.*, un campione di un soggetto avente un cancro in lenta progressione e/o di un soggetto non avente un cancro, uno o più scompartimenti del campione e/o materiale didattico che descrive le prestazioni di un metodo dell'invenzione e controlli o standard specifici per il tessuto.

I mezzi per determinare il livello di GPRC5D possono inoltre comprendere, per esempio, tamponi o altri reagenti da usare in un saggio per

determinare il livello di GPRC5D. Le istruzioni possono essere, per esempio, istruzioni stampate per svolgere il saggio e/o istruzioni per la valutazione del livello di espressione di GPRC5D.

I kit descritti possono anche comprendere mezzi per isolare un campione da un soggetto. Questi mezzi possono comprendere uno o più elementi di apparecchiatura o reagenti che possono essere usati per ottenere un fluido o un tessuto da un soggetto. I mezzi per ottenere un campione da un soggetto possono comprendere anche mezzi per isolare componenti del sangue, come il siero, da un campione di sangue. Preferibilmente, il kit è progettato per essere usato su soggetti umani.

Anticorpi multispecifici

I domini di legame degli anticorpi anti-GPRC5D descritti nel presente contesto riconoscono le cellule che esprimono GPRC5D sulla loro superficie. Come notato sopra, l'espressione di GPRC5D può essere indicativa di una cellula cancerosa. È possibile conseguire un bersagliamento più specifico per particolari sottoinsiemi di cellule realizzando molecole bispecifiche, come anticorpi o frammenti di anticorpi, che si legano a GPRC5D e a un altro bersaglio, come CD3 e BCMA. Questo è conseguito realizzando una molecola che comprende una prima regione che si lega a GPRC5D e una seconda regione che si lega all'altro antigene bersaglio. Le regioni leganti l'antigene possono assumere qualsiasi forma che consenta il riconoscimento specifico del bersaglio, per esempio la regione di legame può essere o può includere un dominio variabile della catena pesante, un Fv (combinazione di un dominio variabile della catena pesante e di un dominio variabile della catena leggera), un dominio di legame basato su un dominio di tipo III della fibronectina (come dalla fibronectina, o basato su un consenso dei domini

di tipo III della fibronectina, o dalla tenascina o basato su un consenso dei domini di tipo III della tenascina, come le molecole Centyrin di Janssen Biotech, Inc., si veda ad es. WO2010/051274 e WO2010/093627). Di conseguenza, vengono fornite molecole bispecifiche comprendenti due differenti regioni leganti l'antigene che legano rispettivamente GPRC5D e un altro antigene.

Alcuni degli anticorpi multispecifici descritti nel presente contesto comprendono due differenti regioni leganti l'antigene che legano rispettivamente GPRC5D e CD3. Nelle forme di realizzazione preferite, vengono forniti anticorpi multispecifici che legano GPRC5D e CD3 (anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3) e frammenti leganti l'antigene multispecifico di essi. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 comprende una prima catena pesante (HC1) e una prima catena leggera (LC1) che si accoppiano per formare un primo sito legante l'antigene che lega specificamente GPRC5D e una seconda catena pesante (HC2) e una seconda catena leggera (LC2) che si accoppiano per formare un secondo sito legante l'antigene che lega specificamente CD3. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 è un anticorpo bispecifico comprendente un braccio GPRC5D-specifico comprendente una prima catena pesante (HC1) e una prima catena leggera (LC1) che si accoppiano per formare un primo sito legante l'antigene che lega specificamente CD3 e un braccio CD3-specifico comprendente una seconda catena pesante (HC2) e una seconda catena leggera (LC2) che si accoppiano per formare un secondo sito legante l'antigene che lega specificamente GPRC5D. Gli anticorpi bispecifici forniti nel presente contesto includono anticorpi aventi una struttura di anticorpo a lunghezza intera. "Anticorpo a lunghezza intera" come usato nel presente contesto si riferisce a un anticorpo

avente due catene pesanti dell'anticorpo a lunghezza intera e due catene leggere dell'anticorpo a lunghezza intera. Una catena pesante (HC) di un anticorpo a lunghezza intera include i domini variabili e costanti della catena pesante VH, CH1, CH2 e CH3. Una catena leggera (LC) di un anticorpo a lunghezza intera include i domini variabili e costanti della catena leggera VL e CL. L'anticorpo a lunghezza intera può essere privo della lisina (K) C-terminale in una o entrambe le catene pesanti. Il termine "braccio Fab" o "mezza molecola" si riferisce a una coppia catena pesante-catena leggera che lega specificamente un antigene. In alcune forme di realizzazione, uno dei domini leganti l'antigene è un dominio di legame non basato sugli anticorpi, *ad es.* un dominio di legame basato su un dominio di fibronectina di tipo 3, *ad es.* Centyrin.

Il braccio legante GPRC5D degli anticorpi multispecifici forniti nel presente contesto deriva dagli anticorpi GPRC5D-specifici dell'invenzione. La prima regione legante l'antigene che lega GPRC5D comprende la catena pesante CDR1, CDR2 e CDR3 del clone GC5B596.

La prima regione legante l'antigene che lega GPRC5D comprende la catena pesante CDR1, CDR2 e CDR3 e la catena leggera CDR1, CDR2 e CDR3 del clone GC5B596. La prima regione legante l'antigene che lega GPRC5D comprende il dominio variabile della catena pesante del clone GC5B596. La prima regione legante l'antigene che lega GPRC5D comprende il dominio variabile della catena pesante e il dominio variabile della catena leggera del clone GC5B596. La tabella 3 fornisce un elenco di anticorpi bi-specifici GPRC5D x CD3 che hanno una coppia di catene pesanti e leggere specifiche per GPRC5D e un'altra coppia di catene pesanti e leggere specifiche per CD3, dove è elencato l'ID dell'anticorpo specifico per descrivere i bracci dell'anticorpo antigene-specifici usati per produrre

l'anticorpo descritto.

Tabella 3

Braccio GPRC5D-specifico = ID Ab	Braccio CD3-specifico = ID Ab
GCSB81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GCSB483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GCSB382	CD3B219
GCSB379	CD3B219
GCSB373	CD3B219
GCSB376	CD3B219
GC5B385	CD3B219
GCSB370	CD3B219
GCSB602	CD3B219
GCSB603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GCSB601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

In alcune forme di realizzazione degli anticorpi bispecifici, il braccio legante GPRC5D lega anche GPRC5D di cynomolgus, preferibilmente al dominio extracellulare di esso.

In alcune forme di realizzazione, il braccio legante GPRC5D dell'anticorpo multispecifico è IgG o un derivato di esso, ad es. gli isotipi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In alcune forme di realizzazione in cui il braccio legante GPRC5D ha un isotipo IgG4, esso contiene la/le sostituzione/i S228P, L234A e L235A nella sua regione Fc.

In alcune forme di realizzazione degli anticorpi bispecifici, il secondo braccio legante l'antigene lega il CD3 umano. In alcune forme di realizzazione preferite, il braccio CD3-specifico dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 è derivato da un anticorpo CD3-specifico che lega e attiva le cellule T primarie umane e/o le cellule T primarie della scimmia cynomolgus. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 si lega a un epitopo all'N-terminale di CD3ε. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 viene a contatto con un epitopo che include i sei amminoacidi N-terminali di CD3ε. In alcune forme di realizzazione, il braccio di legame CD3-specifico dell'anticorpo bispecifico deriva dall'anticorpo monoclonale di topo SP34, un isotipo IgG3/lambda di topo. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 comprende le CDR dell'anticorpo SP34. Tali bracci leganti CD3 possono legarsi a CD3 con un'affinità di 5×10^{-7} M o meno, come 1×10^{-7} M o meno, 5×10^{-8} M o meno, 1×10^{-8} M o meno, 5×10^{-9} M o meno, o 1×10^{-9} M o meno. Il braccio legante CD3-specifico può essere una versione umanizzata di un braccio dell'anticorpo monoclonale di topo SP34. L'adattamento di cornice umana (HFA, Human Framework Adaptation) può essere usato per umanizzare l'anticorpo anti-CD3 da cui deriva il braccio CD3-specifico. In alcune forme di realizzazione degli anticorpi bispecifici, il braccio legante CD3 comprende una coppia di catena pesante e leggera selezionate dalla Tabella 2.

In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 è IgG o un

derivato di essa. In alcune forme di realizzazione, il braccio legante CD3 è IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. In alcune forme di realizzazione in cui il braccio legante CD3 ha un isotipo IgG4, esso contiene sostituzioni S228P, L234A, L235A, F405L e R409K nella sua regione Fc. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene legano CD3 ϵ sulle cellule T umane primarie. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene legano CD3 ϵ sulle cellule T primarie di cynomolgus. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene legano CD3 ϵ sulle cellule T primarie umane e di cynomolgus. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene attivano le cellule T CD3+ umane primarie. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene attivano le cellule T CD4+ primarie di cynomolgus.

In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante GPRC5D comprendente una catena pesante del clone di anticorpo GC5B596. In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante GPRC5D comprendente una catena pesante e una catena leggera del clone di anticorpo GC5B596. In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante CD3 comprendente una catena pesante del clone di anticorpo CD3B219. In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante CD3 comprendente una catena pesante e una catena leggera del clone di anticorpo CD3B219. In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante GPRC5D comprendente una catena pesante del clone di anticorpo GC5B596 e un braccio legante CD3 comprendente

una catena pesante del clone di anticorpo CD3B219. In alcune forme di realizzazione è fornito un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 avente un braccio legante GPRC5D comprendente una catena pesante e una catena leggera del clone di anticorpo GC5B596 e un braccio legante CD3 comprendente una catena pesante e una catena leggera del clone di anticorpo CD3B219.

Un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 esemplificativo è fornito nella Tabella 23.

Formati differenti di anticorpi bispecifici sono stati descritti e sono stati recentemente rivisti da Chames e Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo bispecifico della presente invenzione è un diabody, un cross-body, o un anticorpo bispecifico ottenuto tramite uno scambio di braccio Fab controllato.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi bispecifici includono molecole IgG-simili con domini CH3 complementari per forzare un'eterodimerizzazione; molecole a doppio bersagliamento ricombinanti IgG-simili, in cui i due lati della molecola contengono ciascuno il frammento Fab o parte del frammento Fab di almeno due anticorpi differenti; molecole di fusione di IgG, in cui anticorpi IgG a piena lunghezza sono fusi a un frammento Fab extra o parti di un frammento Fab; molecole di fusione di Fc, in cui molecole di Fv a catena singola o diabody stabilizzati sono fusi a domini costanti a catena pesante, regioni di Fc o parti di essi; molecole di fusione di Fab, in cui differenti frammenti Fab sono fusi assieme; anticorpi basati su ScFv e diabody e a catena pesante (ad es. anticorpi di dominio, nanobody) in cui differenti molecole di Fv a catena singola o differenti diabody o differenti anticorpi a catena pesante (ad es. anticorpi di dominio, nanobody) sono fusi tra loro o con un'altra proteina o molecola veicolante.

In alcune forme di realizzazione, molecole IgG-simili con molecole di domini CH3 complementari includono le Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), le Knobs-into-Holes (Genentech), CrossMAbs (Roche) e quelle abbinate elettrostaticamente (Amgen), LUZ-Y (Genentech), il Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono), il Biclonic (Merus) e il DuoBody (Genmab A/S).

In alcune forme di realizzazione, le molecole a doppio bersagliamento IgG-simili ricombinanti includono Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis), Two-in-one Antibody (Genentech), Mabs cross-linked (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) e CovX-body (CovX/Pfizer).

In alcune forme di realizzazione, molecole di fusione di IgG includono Dominio variabile doppio (DVD)-Ig (Abbott), Bispecifico IgG-simile (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) e BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) e TvAb (Roche).

In alcune forme di realizzazione, molecole di fusione di Fc includono fusioni di ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnologia di ribersagliamento a doppia affinità (Fc-DART) (MacroGenics) e Dual(ScFv).sub.2-Fab (Centro nazionale di ricerca per la medicina degli anticorpi, Cina).

In alcune forme di realizzazione, anticorpi bispecifici di fusione di Fab includono F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), bispecifico bivalente (Biotechnol) e Fab-Fv (UCB-Celltech). Gli anticorpi basati su ScFv, diabody e dominio includono, ma non sono limitati a, Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet), diabody in tandem (Tandab) (Affimed), tecnologia di ribersagliamento a doppia affinità (DART)

(MacroGenics), diabody a catena singola (Academic), anticorpi TCR-simili (AIT, ReceptorLogics), fusione di albumina sierica umana- ScFv (Merrimack) e COMBODY (Epigen Biotech), nanobody a doppio bersagliamento (Ablynx), anticorpi soltanto di dominio di catena pesante a doppio bersagliamento.

Anticorpi bispecifici a piena lunghezza dell'invenzione possono essere generati per esempio usando uno scambio di braccio Fab (o scambio di mezza molecola) tra due anticorpi bivalenti monospecifici introducendo sostituzioni in corrispondenza dell'interfaccia di CH3 di catena pesante in ciascuna mezza molecola per favorire una formazione di eterodimero di due mezze molecole di anticorpo aventi specificità distinta sia in vitro in ambiente privo di cellule o usando coespressione. La reazione di scambio di braccio Fab è il risultato di una reazione di isomerizzazione di legame disolfuro e di dissociazione-associazione di domini CH3. I legami disolfuro di catena pesante nelle regioni cerniera degli anticorpi monospecifici progenitori sono ridotti. Le cisteine libere risultanti di uno degli anticorpi monospecifici progenitori formano un legame disolfuro inter-catena pesante con residui di cisteina di una seconda molecola di anticorpo monospecifico progenitore e simultaneamente i domini CH3 degli anticorpi progenitori si rilasciano e si riformano mediante dissociazione-associazione. I domini CH3 dei bracci Fab possono essere ingegnerizzati per favorire l'eterodimerizzazione rispetto all'omodimerizzazione. Il prodotto risultante è un anticorpo bispecifico avente due bracci Fab o mezze molecole, ciascuna delle quali lega un epitopo distinto, vale a dire un epitopo su GPRC5D e un epitopo su CD3.

"Omodimerizzazione" come usato nel presente contesto si riferisce a un'interazione di due catene pesanti aventi sequenze di amminoacidi CH3 identiche. "Omodimero" come usato nel presente contesto si riferisce a un anticorpo avente due catene pesanti con sequenze di amminoacidi CH3 identiche.

"Eterodimerizzazione" come usato nel presente contesto si riferisce a un'interazione di due catene pesanti aventi sequenze di amminoacidi CH3 non identiche. "Eterodimero" come usato nel presente contesto si riferisce a un anticorpo avente due catene pesanti con sequenze di amminoacidi CH3 non identiche.

La strategia del "knob-in-hole" (si veda, ad es., la pubbl. int. PCT n. WO 2006/028936) può essere usata per generare anticorpi bispecifici a piena lunghezza. Brevemente, amminoacidi selezionati che formano l'interfaccia dei domini CH3 in IgG umana possono essere mutati in corrispondenza di posizioni che influenzano le interazioni del dominio CH3 per promuovere la formazione di eterodimeri. Un amminoacido con una piccola catena laterale (hole) è introdotto in una catena pesante di un anticorpo legante specificamente un primo antigene e un amminoacido con una grande catena laterale (knob) è introdotto in una catena pesante di un anticorpo legante specificamente un secondo antigene. Dopo una coespressione dei due anticorpi, è formato un eterodimero come risultato dell'interazione preferenziale della catena pesante con un "foro" con la catena pesante con una "sporgenza". Coppie di sostituzione di CH3 esemplificative che formano una sporgenza e un foro sono (esprese come posizione modificata nel primo dominio CH3 della prima catena pesante/posizione modificata nel secondo dominio CH3 della seconda catena pesante): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S e T366W/T366S_L368A_Y407V.

Possono essere usate altre strategie come la promozione dell'eterodimerizzazione della catena pesante usando interazioni elettrostatiche mediante sostituzione dei residui caricati positivamente in corrispondenza di una

superficie di CH3 e residui caricati negativamente in corrispondenza di una seconda superficie di CH3, come descritto nella pubbl. di brevetto U.S. n. US2010/0015133; pubbl. di brevetto U.S. n. US2009/0182127; pubbl. di brevetto U.S. n. US2010/028637 o pubbl. di brevetto U.S. n. US2011/0123532. In altre strategie, l'eterodimerizzazione può essere promossa dalle seguenti sostituzioni (esprese come posizione modificata nel primo dominio CH3 della prima catena pesante/posizione modificata nel secondo dominio CH3 della seconda catena pesante): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, o T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W come descritto nella pubbl. di brevetto U.S. n. US2012/0149876 o nella pubbl. di brevetto n. US2013/0195849.

In aggiunta ai metodi descritti sopra, anticorpi bispecifici dell'invenzione possono essere generati in vitro in un ambiente privo di cellule introducendo mutazioni asimmetriche nelle regioni CH3 di due anticorpi omodimerici monospecifici e formando l'anticorpo eterodimerico bispecifico da due anticorpi omodimerici monospecifici progenitori in condizioni riducenti per consentire l'isomerizzazione del legame disolfuro secondo metodi descritti nella pubbl. di brevetto int. n. WO2011/131746. Nei metodi, il primo anticorpo bivalente monospecifico (ad es. anticorpo anti-GPRC5D) e il secondo anticorpo bivalente monospecifico (ad es. anticorpo anti-CD3) sono ingegnerizzati per avere certe sostituzioni in corrispondenza del dominio CH3 che promuove la stabilità dell'eterodimero; gli anticorpi sono incubati assieme in condizioni riducenti sufficienti a consentire alle cisteine nella regione cerniera di subire

l'isomerizzazione del legame disolfuro; generando in tal modo l'anticorpo bispecifico mediante scambio del braccio Fab. Le condizioni di incubazione possono essere ripristinate ottimamente a condizioni non riducenti. Agenti riducenti esemplificativi che possono essere usati sono 2-mercaptoetilammina (2-MEA), ditioneitololo (DTT), ditioneritolo (DTE), glutathione, tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP), L-cisteina e beta-mercaptoetanolo, preferibilmente un agente riducente selezionato dal gruppo consistente in: 2-mercaptoetilammina, ditioneitololo e tris(2-carbossietil)fosfina. Per esempio, può essere usata un'incubazione per almeno 90 min a una temperatura di almeno 20 °C in presenza di almeno 2-MEA 25 mM o in presenza di almeno ditioneitololo 0,5 mM a un pH da 5-8, per esempio a pH di 7,0 o a pH di 7,4.

In aggiunta agli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 descritti, vengono fornite anche sequenze di polinucleotidi capaci di codificare gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 descritti. Sono anche forniti vettori comprendenti i polinucleotidi descritti, così come cellule che esprimono gli anticorpi multispecifici GPRC5D x CD3 forniti nel presente contesto. Descritte sono anche cellule capaci di esprimere i vettori divulgati. Queste cellule possono essere cellule di mammifero (come cellule 293F, cellule CHO), cellule di insetto (come cellule Sf7), cellule di lievito, cellule di pianta, o cellule di batteri (come *E. coli*). Gli anticorpi descritti possono anche essere prodotti da cellule di ibridoma.

Composizione terapeutica e metodi di trattamento usando anticorpi multispecifici e frammenti leganti l'antigene multispecifici di essi

Gli anticorpi bispecifici GPRC5D disaminati sopra, per esempio gli anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 disaminati sopra, sono utili nella terapia. In particolare, gli anticorpi bispecifici GPRC5D sono utili nel trattamento del cancro. Nel presente

contesto sono anche fornite composizioni terapeutiche per il trattamento di un disturbo iperproliferativo in un mammifero che comprende una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo multispecifico o di un frammento legante l'antigene multispecifico descritto nel presente contesto e un veicolante farmaceuticamente accettabile. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. In una forma di realizzazione, detta composizione farmaceutica è per il trattamento di un cancro che esprime GPRC5D, inclusi (ma non limitati a) i seguenti: cancri a cellule B che esprimono GPRC5D, come il mieloma multiplo (MM); e altri cancri ancora da determinare in cui è espresso GPRC5D. Anticorpi bispecifici particolari che possono essere usati per trattare il cancro, come il cancro ematologico, inclusi i cancri specifici disaminati sopra, includono GC5B596.

Le composizioni farmaceutiche fornite nel presente contesto comprendono: a) una quantità efficace di un anticorpo multispecifico o di un frammento di anticorpo della presente invenzione e b) un veicolante farmaceuticamente accettabile, che può essere inerte o fisiologicamente attivo. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. Come usato nel presente contesto, la locuzione "veicolanti farmaceuticamente accettabili" include qualsiasi e tutti i solventi, i mezzi di dispersione, i rivestimenti, gli agenti antibatterici e antimicotici e simili che siano fisiologicamente compatibili. Esempi di veicolanti, diluenti e/o eccipienti adatti includono uno o più tra acqua, soluzione salina, soluzione salina tamponata con fosfato, destrosio, glicerolo, etanolo e simili, nonché qualsiasi

combinazione di essi. In molti casi è preferibile includere nella composizione agenti isotonici, come zuccheri, polialcoli o cloruro di sodio. In particolare, esempi rilevanti di veicolante idoneo includono: (1) soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco, pH circa 7,4, contenente o non contenente circa da 1 mg/ml a 25 mg/ml di albumina sierica umana, (2) soluzione salina allo 0,9% (0,9% p/v di cloruro di sodio (NaCl)) e (3) destrosio al 5% (p/v); e può anche contenere un antiossidante come la triptamina e un agente stabilizzante come il Tween 20®.

Le composizioni nel presente contesto possono anche contenere un ulteriore agente terapeutico, se necessario per il particolare disturbo da trattare. Preferibilmente, l'anticorpo multispecifico o il frammento di anticorpo e il composto attivo supplementare hanno attività complementari che non si influenzano negativamente a vicenda. In una forma di realizzazione preferita, l'ulteriore agente terapeutico è citarabina, un'antraciclina, istamina dicloridrato o interleuchina 2. In una forma di realizzazione preferita, l'ulteriore agente terapeutico è un agente chemioterapico.

Le composizioni dell'invenzione possono essere in una varietà di forme. Queste includono per esempio, forme di dosaggio liquide, semisolide e solide, ma la forma preferita dipende dalla modalità di somministrazione e dall'applicazione terapeutica previste. Le composizioni preferite tipiche sono sotto forma di soluzioni iniettabili o infondibili. La modalità di somministrazione preferita è quella parenterale (ad es., endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, sottocutanea). In una forma di realizzazione preferita, le composizioni dell'invenzione vengono somministrate per via endovenosa come bolo o mediante infusione continua per un periodo di tempo. In un'altra forma di realizzazione preferita, vengono iniettati mediante via intramuscolare, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoiale,

intratumorale, peritumorale, intralesionale o perilesionale, per esercitare effetti terapeutici locali nonché sistemici.

Le composizioni sterili per la somministrazione parenterale possono essere preparate incorporando l'anticorpo, il frammento di anticorpo o il coniugato di anticorpo della presente invenzione nella quantità richiesta nel solvente appropriato, seguito dalla sterilizzazione mediante microfiltrazione. Come solvente o veicolo possono essere usati acqua, soluzione salina, soluzione salina tamponata con fosfato, destrosio, glicerolo, etanolo e simili, nonché una combinazione di essi. In molti casi sarà preferibile includere nella composizione agenti isotonici, come zuccheri, polialcoli o cloruro di sodio. Queste composizioni possono contenere anche adiuvanti, in particolare agenti bagnanti, isotonizzanti, emulsionanti, disperdenti e stabilizzanti. Le composizioni sterili per la somministrazione parenterale possono anche essere preparate sotto forma di composizioni solide sterili che possono essere dissolte al momento dell'uso in acqua sterile o in qualsiasi altro mezzo sterile iniettabile.

L'anticorpo multispecifico o il frammento di anticorpo può essere somministrato anche per via orale. Come composizioni solide per la somministrazione orale possono essere usati compresse, pillole, polveri (capsule di gelatina, bustine) o granuli. In queste composizioni, il principio attivo secondo l'invenzione viene miscelato con uno o più diluenti inerti, quali amido, cellulosa, saccarosio, lattosio o silice, sotto corrente di argon. Queste composizioni possono comprendere anche sostanze diverse dai diluenti, per esempio uno o più lubrificanti come stearato di magnesio o talco, un colorante, un rivestimento (compressa rivestita di zucchero) o una glassa.

Come composizioni liquide per la somministrazione orale, possono essere

usate soluzioni, sospensioni, emulsioni, sciroppi ed elisir farmaceuticamente accettabili contenenti diluenti inerti quali acqua, etanolo, glicerolo, oli vegetali o olio di paraffina. Queste composizioni possono comprendere sostanze diverse dai diluenti, per esempio prodotti bagnanti, dolcificanti, addensanti, aromatizzanti o stabilizzanti.

Le dosi dipendono dall'effetto desiderato, dalla durata del trattamento e dalla via di somministrazione usata; in genere sono tra 5 mg e 1000 mg al giorno per via orale per un adulto, con dosi unitarie che variano da 1 mg a 250 mg di sostanza attiva. In generale, il medico determina il dosaggio appropriato in base all'età, al peso e ad altri fattori specifici del soggetto da trattare.

Vengono anche forniti nel presente contesto metodi per uccidere una cellula GPRC5D+ somministrando a un paziente che necessita di essa un anticorpo multispecifico che lega detto GPRC5D ed è in grado di reclutare le cellule T per uccidere detta cellula GPRC5D+ (vale a dire, reindirizzamento delle cellule T). Qualsiasi degli anticorpi multispecifici o frammenti di anticorpi dell'invenzione possono essere usati terapeuticamente. Per esempio, in una forma di realizzazione, l'anticorpo multispecifico GPRC5D x CD3 può essere usato terapeuticamente per trattare il cancro in un soggetto.

In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi multispecifici o i frammenti di anticorpi dell'invenzione vengono usati per il trattamento di un disturbo iperproliferativo in un mammifero. In una forma di realizzazione più preferita, una delle composizioni farmaceutiche sopra divulgate, e che contiene un anticorpo multispecifico o un frammento di anticorpo dell'invenzione, viene usata per il trattamento di un disturbo iperproliferativo in un mammifero. In una forma di realizzazione il disturbo è un cancro. In particolare, il cancro è un cancro che esprime GPRC5D, inclusi (ma non limitati a) i seguenti: cancri a cellule B che

esprimono GPRC5D, come il mieloma multiplo (MM); e altri cancro ancora da determinare in cui è espresso GPRC5D. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso.

Di conseguenza, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono utili nel trattamento o nella prevenzione di una varietà di cancro, inclusi (ma non limitati a) i seguenti: un cancro che esprime GPRC5D, inclusi (ma non limitati a) i seguenti: cancro a cellule B/plasmatiche che esprimono GPRC5D, come il mieloma multiplo (MM) acuto o i mielomi premaligni come MGUS (gammopatia monoclonale di significato indeterminato) e SMM (mieloma multiplo smoldering) e il plasmocitoma; e altri cancro ancora da determinare in cui è espresso GPRC5D.

Analogamente, nel presente contesto viene inoltre fornito un metodo per inibire la crescita di popolazioni cellulari selezionate che comprende il contatto di cellule bersaglio che esprimono GPRC5D, o di tessuti contenenti tali cellule bersaglio, con una quantità efficace di un anticorpo multispecifico o di un frammento di anticorpo della presente invenzione, da solo o in combinazione con altri agenti citotossici o terapeutici, in presenza di una cellula mononucleata del sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell). Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. In una forma di realizzazione preferita, l'ulteriore agente terapeutico è citarabina, un'antraciclina, istamina dicloridrato o interleuchina 2. In una forma di realizzazione preferita, l'ulteriore agente terapeutico è un agente chemioterapico. Il metodo per inibire la crescita di popolazioni cellulari selezionate può essere praticato *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Esempi di usi *in vitro* includono trattamenti del midollo osseo autologo prima del suo trapianto nello stesso paziente al fine di uccidere le cellule malate o maligne; trattamenti del midollo osseo prima del trapianto al fine di uccidere le cellule T competenti e prevenire la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD, Graft-Versus-Host-Disease); trattamenti di colture cellulari al fine di uccidere tutte le cellule, ad eccezione delle varianti desiderate che non esprimono l'antigene bersaglio; o per uccidere le varianti che esprimono l'antigene indesiderato. Le condizioni dell'uso non-clinico *in vitro* è facilmente determinato da un esperto dell'arte.

Esempi di uso clinico *ex vivo* sono rimuovere le cellule di tumore dal midollo osseo prima del trapianto autologo nel trattamento del cancro. Il trattamento può essere compiuto come segue. Il midollo osseo viene prelevato dal paziente o da un altro individuo e quindi incubato in un mezzo contenente siero a cui viene aggiunto l'agente citotossico dell'invenzione. Le concentrazioni variano da circa 10 uM a 1 uM, per un periodo da circa 30 min a circa 48 h a circa 37 °C. Le condizioni esatte di concentrazione e il tempo di incubazione, vale a dire la dose, sono facilmente determinate da un esperto dell'arte. Dopo l'incubazione, le cellule del midollo osseo vengono lavate con un mezzo contenente siero e reinfuse nel paziente mediante infusione i.v. secondo metodi noti. In circostanze in cui il paziente riceve altri trattamenti, come un ciclo di chemioterapia ablativa o irradiazione corporea totale, tra il momento del prelievo del midollo e la reinfusione delle cellule trattate, le cellule del midollo trattate vengono conservate congelate in azoto liquido usando apparecchiature mediche standard.

Per l'uso clinico *in vivo*, una quantità terapeuticamente efficace dell'anticorpo multispecifico o del frammento legante l'antigene viene somministrata a un soggetto che necessita di esso. Per esempio, gli anticorpi

multispecifici GPRC5D x CD3 e i frammenti leganti l'antigene multispecifici di essi possono essere utili nel trattamento di un cancro che esprime GPRC5D in un soggetto che necessita di essi. In alcune forme di realizzazione, il cancro che esprime GPRC5D è un cancro a cellule B, come il mieloma multiplo (MM). Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. In alcune forme di realizzazione il soggetto è un mammifero, preferibilmente un essere umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo multispecifico o il frammento legante l'antigene viene somministrato come una soluzione che è stata sottoposta a prova per la sterilità.

I regimi di dosaggio nei metodi di trattamento e negli usi sopra vengono aggiustati per fornire la risposta ottimale desiderata (ad es., una risposta terapeutica). Per esempio, può essere somministrato un singolo bolo, possono essere somministrate svariate dosi divise nel tempo o la dose può essere proporzionalmente ridotta o aumentata come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. Le composizioni parenterali possono essere formulate in forma unitaria di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio.

I dosaggi efficaci e i regimi di dosaggio per gli anticorpi e i frammenti multispecifici dipendono dalla malattia o dalla condizione da trattare e possono essere determinati da un esperto dell'arte. Un intervallo esemplificativo, non limitativo per una quantità terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione è circa 0,001-10 mg/kg, come circa 0,001-5 mg/kg, per esempio circa 0,001-2 mg/kg, come circa 0,001-1 mg/kg, ad esempio circa 0,001, circa 0,01, circa 0,1, circa 1 o circa 10 mg/kg.

Un medico o un veterinario avente comune esperienza nell'arte può

facilmente determinare e prescrivere la quantità efficace della composizione farmaceutica richiesta. Per esempio, il medico o il veterinario possono iniziare a somministrare dosi di anticorpo o frammento multispecifico impiegato nella composizione farmaceutica a livelli inferiori a quelli richiesti al fine di conseguire l'effetto terapeutico desiderato e aumentare gradualmente il dosaggio fino a quando è conseguito l'effetto desiderato. In generale, una dose giornaliera idonea di un anticorpo bispecifico della presente invenzione è quella quantità del composto che è la dose più bassa efficace per produrre un effetto terapeutico. La somministrazione può essere ad es. parenterale, come endovenosa, intramuscolare o sottocutanea. In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento multispecifico può essere somministrato mediante infusione in un dosaggio settimanale calcolato in mg/m^2 . Tali dosaggi possono, per esempio, essere basati sui dosaggi mg/kg forniti sopra secondo il seguente: dose $(\text{mg}/\text{kg}) \times 70$: 1,8. Tale somministrazione può essere ripetuta, ad es., da 1 a 8 volte, come da 3 a 5 volte. La somministrazione può essere svolta mediante infusione continua per un periodo da 2 a 24 h, come da 2 a 12 h. In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento multispecifico può essere somministrato mediante infusione continua lenta per un lungo periodo, come più di 24 ore, al fine di ridurre gli effetti collaterali tossici.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento multispecifico può essere somministrato in un dosaggio settimanale calcolato come dose fissa fino a otto volte, come da quattro a sei volte quando somministrato una volta alla settimana. Tale regime può essere ripetuto una o più volte, se necessario, per esempio dopo sei mesi o dodici mesi. Tali dosaggi fissi possono, per esempio, essere basati sui dosaggi mg/kg forniti sopra, con una stima del peso corporeo di

70 kg. Il dosaggio può essere determinato o aggiustato misurando la quantità di anticorpo bispecifico della presente invenzione nel sangue al momento della somministrazione, per esempio prelevando un campione biologico e usando anticorpi anti-idiotipo che mirano la regione legante l'antigene GPRC5D degli anticorpi multispecifici della presente invenzione.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo o il frammento multispecifico può essere somministrato mediante terapia di mantenimento, come, ad es. una volta alla settimana per un periodo di sei mesi o più.

L'anticorpo o il frammento multispecifico può anche essere somministrato profilatticamente al fine di ridurre il rischio di sviluppare un cancro, ritardare l'insorgenza della comparsa di un evento nella progressione del cancro, e/o ridurre il rischio di recidiva quando un cancro è in remissione.

Gli anticorpi multispecifici e i frammenti di essi, come descritti nel presente contesto, possono anche essere somministrati in terapia combinata, vale a dire combinati con altri agenti terapeutici rilevanti per la malattia o la condizione da trattare. Di conseguenza, in una forma di realizzazione, il medicinale contenente anticorpi è per la combinazione con uno o più ulteriori agenti terapeutici, come un agente chemioterapico. In alcune forme di realizzazione, l'altro agente terapeutico è la citarabina, un'antraciclina, l'istamina dicloridrato o l'interleuchina 2. Tale somministrazione combinata può essere simultanea, separata o sequenziale, in qualsiasi ordine. Per la somministrazione simultanea, gli agenti possono essere somministrati come una composizione o come composizioni separate, se appropriato.

In una forma di realizzazione, viene fornito un metodo per il trattamento di un disturbo che implica cellule che esprimono GPRC5D in un soggetto, il quale

metodo comprende la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo o frammento multispecifico, come un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 descritto nel presente contesto, e radioterapia a un soggetto che necessita di esso. In una forma di realizzazione viene fornito un metodo per trattare o prevenire il cancro, il quale metodo comprende la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo o frammento multispecifico, come un anticorpo GPRC5D x CD3 descritto nel presente contesto, e radioterapia a un soggetto che necessita di esso. La radioterapia può comprendere radiazioni o la somministrazione associata di radiofarmaci ad un paziente. La fonte di radiazioni può essere esterna o interna al paziente trattato (la radioterapia può, per esempio, essere sotto forma di radioterapia a fascio esterno (EBRT, External Beam Radiation Therapy) o brachiterapia (BT)). Gli elementi radioattivi che possono essere usati nella pratica di tali metodi includono, ad es., radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, rame-67, tecnezio-99, ioduro-123, ioduro-131 e indio-111.

Kit

Anche forniti nel presente contesto sono inclusi kit, ad es., comprendenti un anticorpo multispecifico descritto o un frammento legante l'antigene di esso e istruzioni per l'uso dell'anticorpo o dei frammenti per l'uccisione di particolari tipi di cellule. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. Le istruzioni possono includere direttive per l'uso dell'anticorpo multispecifico o del frammento legante l'antigene di esso in vitro, in vivo o ex vivo.

Tipicamente, il kit ha uno scomparto contenente l'anticorpo multispecifico

o il frammento legante l'antigene di esso. L'anticorpo multispecifico o il frammento legante l'antigene di esso può essere in forma liofilizzata, liquida o in altra forma ritoccabile per essere incluso in un kit. Il kit può anche contenere elementi aggiuntivi necessari per mettere in pratica il metodo descritto nelle istruzioni del kit, come una soluzione sterilizzata per ricostituire una polvere liofilizzata, agenti aggiuntivi per la combinazione con l'anticorpo multispecifico o il frammento legante l'antigene di esso prima della somministrazione a un paziente e strumenti che aiutano a somministrare l'anticorpo multispecifico o il frammento legante l'antigene di esso a un paziente.

Usi diagnostici

Gli anticorpi multispecifici e i frammenti descritti nel presente contesto possono essere usati anche a scopi diagnostici. Dunque, vengono fornite anche composizioni diagnostiche comprendenti un anticorpo multispecifico o frammenti come definito nel presente contesto, e il suo uso. Nelle forme di realizzazione preferite, l'anticorpo multispecifico è un anticorpo GPRC5D x CD3-bispecifico dell'invenzione, o un frammento legante l'antigene GPRC5D x CD3-bispecifico di esso. Nel presente contesto viene divulgato un kit per la diagnosi del cancro comprendente un contenitore comprendente un anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 e uno o più reagenti per rilevare il legame dell'anticorpo a GPRC5D. I reagenti possono includere, per esempio, tag fluorescenti, tag enzimatici o altri tag rilevabili. I reagenti possono anche includere anticorpi secondari o terziari o reagenti per reazioni enzimatiche, in cui le reazioni enzimatiche producono un prodotto che può essere visualizzato. Per esempio, gli anticorpi multispecifici descritti nel presente contesto, o i frammenti leganti l'antigene di essi, possono essere tracciati con un radiotracciante, un tracciante fluorescente, un tag epitopo,

biotina, un tracciante cromoforo, un tracciante ECL, un enzima, rutenio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA), perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina e beta-galattosidasi, o polistidina o simili traccianti noti nell'arte.

Esempi

Gli esempi che non divulgano il composto attualmente rivendicato sono esempi di riferimento.

Esempio 1: antigeni

Per via delle difficoltà nella produzione di antigeni GPRC5D ricombinanti, le linee cellulari trasfettate che visualizzano GPRC5D [umano (ID di SEQ n. 22), cyno (ID di SEQ n. 23) e murino (ID di SEQ n. 24)] sono state generate usando metodi standard da usare come antigeni di cellule intere per studi di generazione e caratterizzazione di anticorpi (Tabella 4).

Tabella 4. Linee cellulari che esprimono GPRC5D

Proteina	Linea di cellule	Promotore	Resistenza
GPRC5D umano	HEK293T	CMV	Neomicina
GPRC5D di Cyno	HEK293F	CMV	Blasticidina

Esempio 2: generazione di anticorpi GPRC5D usando la visualizzazione di fagi

Nella generazione di anticorpi GPRC5D mediante fago sono stati seguiti due approcci distinti: il panning cellulare standard (selezione negativa) e il panning cellulare fagico FACS (selezione competitiva).

Panning standard dei fagi su cellule (selezione negativa)

Le librerie di fagi de novo interne sono state descritte in dettaglio (Shi et al (2010) J. Mol. Biol. 397:385-396; pubbl. di brevetto int. n. WO09/085462). Queste librerie sono state costruite su tre geni di linea germinale VH umani (IGHV1-69, 3-23, 5-51) e quattro geni di linea germinale VL umani (A27, B3, L6, 012) progettati per avere un'elevata diversità in CDR-H3. Tre librerie di fagi de novo (DNP00004 -169HC / mix LC, DNP00005 -323HC / mix LC e DNP00006 -551HC / mix LC) che visualizzano varianti Fab sulla proteina di rivestimento del fago pIX sono state sottoposte a panning con cellule stabili HEK293 G5 che esprimono GPRC5D (cellule bersaglio) per i cicli 1, 3, 5 e per i cicli 2 e 4 il ciclo precedente di fagi pIX-Fab amplificati è stato applicato alle cellule di sfondo HEK293 (selezione negativa) (si veda Tabella 5). Il fago pIX-Fab de novo del ciclo 1 legato alle cellule bersaglio è stato recuperato per l'amplificazione di una notte. Il fago selezionato nel ciclo 1 è stato applicato alle cellule di sfondo per il ciclo 2, dove il fago pIX-Fab non legato è stato recuperato per l'amplificazione di una notte del fago selezionato negativamente. Sono stati svolti altri cicli di panning positivi e negativi, cicli 3 e 4. Il ciclo finale è stato svolto con l'ultimo ciclo di fagi amplificati selezionati negativamente, suddivisi in due campioni di panning, uno per le cellule bersaglio e uno per il panning delle cellule di sfondo.

Tabella 5: diagramma di flusso di panning di fagi su cellule standard-selezione negativa

Ciclo di panning	Cellule usate come antigene
1	HEK293 GPRC5D umane
2	HEK293
3	HEK 293 GPRC5D umane

Ciclo di panning	Cellule usate come antigene
4	HEK293
5 (diviso)	HEK 293 GPRC5D umane
	HEK 293

Panning standard di fagi su cellule (selezione dello sfondo)

Le librerie di visualizzazione di fagi pIX-Fab sono state aggiunte alle cellule HEK293 seguendo ambienti e tempi di incubazione simili a quelli svolti con la procedura standard di panning su cellule menzionata in precedenza (Tabella 6). Dopo tre cicli, il DNA corrispondente al fago pIX-Fab legato a HEK293 è stato usato per produrre ampliconi PCR per NGS. Questi risultati NGS sono usati in un'analisi sottrattiva dinamica aggiuntiva all'interno del software NGS2.0 per aiutare a distinguere possibili candidati Fab specifici per bersaglio.

Tabella 6: diagramma di flusso standard per il panning di fagi su cellule-selezione dello sfondo

Ciclo di panning	Cellule usate come antigene
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK 293

Panning di fagi su cellule FACS (selezione competitiva)

Sono stati svolti tre cicli di panning applicando contemporaneamente il fago pIX-Fab a una miscela di cellule bersaglio e cellule di sfondo (Tabella 7). Per

i cicli 1 e 2 le cellule bersaglio con il fago pIX-Fab attaccato sono state smistate mediante l'uso del segnale GFP. Per catturare il fago pIX-Fab legato dalle cellule smistate è stata applicata una lisi cellulare acida seguita da un'infezione da E. coli. Il fago pIX-Fab amplificato del ciclo 2 e la miscela di cellule sono stati smistati in due popolazioni nel ciclo finale, gated per le cellule bersaglio GFP e gated per le cellule di sfondo non GFP. Il fago pIX-Fab legato per entrambe le popolazioni cellulari è stato catturato mediante lisi acida e infezione da E. coli

Tabella 7: diagramma di flusso del panning di fagi su cellule FACS-selezione competitiva

Ciclo di panning	Cellule usate come antigene
1	GPRC5D_GFP umano HEK293 e HEK 293
2	GPRC5D_GFP umano HEK293 e HEK 293
3	GPRC5D_GFP umano HEK293 e HEK 293

Sequenziamento di nuova generazione (NGS) del panning di fagi

La crescita di una notte sotto repressione da glucosio è stata effettuata per i sei campioni dell'ultimo ciclo di panning. Queste colture sono state usate per realizzare il kit mini prep-DNA, Qiagen QIAspin DNA. I sei campioni di DNA sono stati usati come stampo PCR per generare ampliconi che misuravano da HCDR1 a HCDR3. I sei ampliconi sono stati purificati su gel e raggruppati in pool mantenendo separate le versioni 2.1 e 3.0 per il panning su cellule standard e raggruppati in pool completamente per il panning su cellule FACS. Questi ampliconi purificati su gel raggruppati in pool sono stati forniti ai servizi Genewiz NGS per il processamento mediante la tecnologia MiSeq 1x300. I file sono stati consegnati da Genewiz e caricati su un server locale (nas2.0). All'interno di questo

server è stata usata l'applicazione software NGS2.0 per caricare, leggere e analizzare i file di sequenza. Le prime 88 sequenze secondo il numero di copie (>50) e il rapporto tra sequenze della cellula bersaglio (+) e della cellula di sfondo (-) (rapporto >5:1) sono state selezionate per la conversione IgG. Siccome solo la sequenza variabile della catena pesante è determinata mediante l'NGS, è stato necessario costruire elettronicamente i costrutti a catena pesante intera nelle cornici appropriate. In aggiunta, dal momento che era nota solo la sequenza della catena pesante, ciascuno dei candidati è stato accoppiato con le quattro catene leggere parentali (A27, B3, L6, 012). La conversione finale per i candidati è stata effettuata come IgG4PAA umana.

Screening ELISA e sequenziamento standard

Dalla stessa preparazione del DNA usata per NGS, è stata effettuata una digestione con enzima di restrizione e un'autoligazione per scindere il gene pIX e permettere l'espressione di Fab solubile. Novantadue colonie, prelevate da ciascuno dei tre campioni di panning, sono state esaminate per l'espressione di Fab mediante ELISA e sono state sequenziate per determinare sia la catena pesante che la catena leggera mediante il metodo Sanger. I candidati finali con sequenza diversificata all'interno delle LCDR sono stati clonati in plasmidi di espressione nei mammiferi.

Esempio 4: caratterizzazione iniziale degli anticorpi GPRC5D

Ottenuta attraverso la tecnologia di visualizzazione di fagi

Legame a GPRC5D

Il panning di fagi su cellula intera è stato completato usando le cellule GPRC5D umane come antigene, come descritto sopra. Dopo l'analisi NGS, per

ciascuno dei candidati era nota solo la sequenza della catena pesante. Di conseguenza, ciascuna catena pesante doveva essere accoppiata con le 4 catene leggere parentali (A27, B3, L6, 012), dando come risultato 348 mAb da 87 sequenze Hc identificate usando NGS. Inizialmente, questi mAb sono stati valutati per il legame a cyno GPRC5D usando FACS. Per lo screening iniziale è stata selezionata la linea di cellule cyno GPRC5D per massimizzare il potenziale segnale di legame, siccome la linea di cellule cyno GPRC5D aveva un livello di espressione più elevato di quello della linea di cellule GPRC5D umana. In breve, lo screening FACS è stato svolto normalizzando la concentrazione proteica a 1 ug/ml e 100 ul di proteine sono stati miscelati con 200.000 cellule per pozzetto. È stata consentita l'incubazione del mAb con le cellule per 1 ora a 4 °C. Le cellule sono state quindi lavate tre volte con PBS e FBS allo 0,2%. Come reagente di rilevamento è stato quindi aggiunto un mAb secondario anti-umano coniugato con PE (Jackson cat. n. 709-116-149). Le cellule e l'anticorpo secondario sono stati incubati per 1 ora a 4 °C. Le cellule sono state quindi lavate tre volte con PBS e FBS allo 0,2%. Le cellule sono state lavate di nuovo usando PBS e FBS allo 0,2% e quindi analizzate su FACSSarry.

È stato osservato che un gran numero di hit si lega al cyno GPRC5D, inclusi 15 mAb con MFI maggiore di 100.000, 23 mAb con MFI minore di 100.000 ma maggiore di 10.000 e 63 mAb con MFI minore di 10.000 ma maggiore di 1000. (Tabella 8).

Tabella 8: dati di legame FACS per NGS derivati da mAb contro cyno GPRC5D. Le sequenze della catena pesante identificate dall'analisi NGS sono state accoppiate con ciascuna Lc parentale come mostrato. GCSM29 è stato usato come controllo (catena leggera PH9L3). mAb evidenziati hanno un MFI >1000

ID Hc	mAb GPC5D [PH9L1 (A27)]	MFI	mAb GPC5D [PH9L2 (B3)]	MFI	mAb GPC5D [PH9L3 (L6)]	MFI	mAb GPC5D [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	GC5B25	31324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	GC5B68	2682	GC5B69	17416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	GC5B117	5037
GC5H15	GC5B158	14407	GC5B159	139766	GC5B160	84111	GC5B161	7856
GC5H13	GC5B202	89948	GC5B203	9173	GC5B204	15203	GC5B205	52663
GC5H23	GC5B242	242	GC5B243	116641	GC5B244	249	GC5B245	469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	GC5B285	87116
GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	GC5B72	2013	GC5B73	3827
GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	GC5B121	43924
GC5H36	GC5B162	86773	GC5B163	21970	GC5B164	122043	GC5B165	1870
GC5H31	GC5B206	467	GC5B207	3636	GC5B208	481	GC5B209	1409
GC5H29	GC5B246	202	GC5B247	3037	GC5B248	2835	GC5B249	1373
GC5H34	GC5B286	239	GC5B287	163990	GC5B288	259	GC5B289	271
GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	GC5B332	191978	GC5B333	1591
GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	GC5B32	16553	GC5B33	270
GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
GC5H25	GC5B 122	153	GC5B123	237	GC5B124	6026	GC5B125	6197
GC5H30	GC5B166	1510	GC5B167	6266	GC5B168	32482	GC5B169	327
GC5H47	GC5B210	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
GC5H42	GC5B250	3969	GC5B251	213233	GC5B252	63295	GC5B253	574
GC5H37	GC5B290	8839	GC5B291	201024	GC5B292	110940	GC5B293	305
GC5H45	GC5B334	160	GC5B335	1434	GC5B336	3228	GC5B337	309
GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	GC5B36	14936	GC5B37	297
GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	GC5B81	74140

ID Hc	mAb GPRC5D [PH9L1 (A27)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L2 (B3)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L3 (L6)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H43	GC5B 126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	GC5B129	1283
GC5H49	GC5B170	1014	GC5B171	51995	GC5B172	1434	GC5B173	332
GC5H62	GC5B214	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	GC5B217	1589
GC5H60	GC5B254	161	GC5B255	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
GC5H94	GC5B294	190	GC5B295	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	GC5B340	1798	GC5B341	290
GC5H85	GC5B38	10809	GC5B39	1112	GC5B40	110654	GC5B41	4379
GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	GC5B84	1547	GC5B85	3563
GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
GC5H76	GC5B174	219	GC5B175	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
GC5H68	GC5B218	21420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292
GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	GC5B44	2694	GC5B45	1022
GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	GC5B89	41027
GC5H50	GC5B 134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	GC5B137	2087
GC5H28	GC5B178	750	GC5B179	6708	GC5B180	1005	GC5B181	535
GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
GC5H51	GC5B262	159	GC5B263	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	GC5B305	1571
GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	GC5B48	1320	GC5B49	392
GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	GC5B92	1848	GC5B93	1780
GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
GC5H99	GC5B182	196	GC5B183	6421	GC5B184	309	GC5B185	280

ID Hc	mAb GPRC5D [PH9L1 (A27)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L2 (B3)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L3 (L6)]	MFI	mAb GPRC5D [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
GC5H48	GC5B266	268	GC5B267	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	GC5B352	4300	GC5B353	1708
GC5H56	GC5B50	229	GC5B51	36679	GC5B52	386	GC5B53	446
GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
GC5H61	GC5B186	543	GC5B187	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
GC5H5	GC5B 17	243	GC5B18	301	GC5B19	1048	GC5B20	384
GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487
GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	GC5B104	3130	GC5B105	456
GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
GC5H73	GC5B190	236	GC5B191	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
GC5H86	GC5B230	17885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
GC5B95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
GC5H78	GC5B 106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
GC5H57	GC5B234	128355	GC5B235	195348	GC5B236	134008	GC5B237	11255
GC5H41	GC5B274	313	GC5B275	7431	GC5B278	435	GC5B279	542

ID Hc	mAb GPCR5D [PH9L1 (A27)]	MFI	mAb GPCR5D [PH9L2 (B3)]	MFI	mAb GPCR5D [PH9L3 (L6)]	MFI	mAb GPCR5D [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H58	GC5B318	2608	GC5B319	5791	GC5B320	49616	GC5B321	4823
GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	GC5B365	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	GC5B110	208487	GC5B111	692	GC5B112	140269	GC5B113	104136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	GC5B238	3698	GC5B239	4370	GC5B240	4676	GC5B241	825
GC5H88	GC5B278	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	GC5B334	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	GC5B368	6313	GC5B369	26116

I 40 mAb con la più alta affinità di legame sono stati selezionati per la caratterizzazione aggiuntiva, che consisteva nella ripetizione dello studio di legame alle cellule GPCR5D di cyno, nonché nella valutazione del legame alle cellule che esprimono GPCR5D umano usando FACS (Tabella 9). Questi dati sono stati analizzati per selezionare 17 mAb per la purificazione e la generazione di anticorpi bispecifici GPCR5D x CD3 (evidenziati). I fattori usati per selezionare mAb per la purificazione e la generazione di anticorpi bispecifici GPCR5D x CD3 includono la specificità del legame con GPCR5D umano, la reattività crociata con cyno GPCR5D e la diversità nella sequenza Hc. Per esempio, GC5H36 è stato accoppiato a tre distinte catene leggere e analizzato per il legame (GC5B162, GC5B163, GC5B164). Solo GC5B164 era avanzato siccome è stato osservato che questo mAb aveva un MFI più elevato per GPCR5D umano rispetto a GC5B162 o GC5B163.

Tabella 9: dati di legame FACS per mAb derivati da NGS alle cellule HEK293F che esprimono GPRC5D umano e di cyno. Per valutare la specificità del legame per GPRC5D sono state usate cellule HEK293F non trasfettate. TF7M1636 è stato usato come controllo isotipico. Gli mAb evidenziati sono stati selezionati per l'ulteriore analisi

ID proteina	ID peptide HC	MFI GPRC5D cyno	MFI GPRC5D umano	MFI 293F
GC5B38	GC5H85	6.864	280	215
GC5B110	GC5H75	142.277	2.543	235
GC5B158	GC5H15	4.923	285	235
GC5B162	GC5H36	75.139	2.981	230
GC5B202	GC5H13	30.470	2.152	256
GC5B218	GC5H68	10.451	277	263
GC5B230	GC5H86	19.103	364	290
GC5B234	GC5H57	134.258	1.657	261
GC5B51	GC5H56	22.661	667	480
GC5B159	GC5H15	129.370	1.987	258
GC5B163	GC5H36	7.605	840	310
GC5B171	GC5H49	24.133	1.144	1.321
GC5B235	GC5H57	158.011	2.643	254
GC5B243	GC5H23	67.848	20.458	221
GC5B251	GC5H42	74.510	11.418	235
GC5B281	GC5H34	109.418	5.317	570
GC5B291	GC5H37	77.798	10.427	880

ID proteina	ID peptide HC	MFI GPRC5D cyno	MFI GPRC5D umano	MFI 293F
GC5B32	GC5H26	3.597	14.656	358
GC5B36	GC5H38	5.353	2.002	352
GC5B40	GC5H85	67.279	4.510	310
GC5B112	GC5H75	104.875	470	433
GC5B160	GC5H15	40.881	635	276
GC5B164	GC5H36	78.672	12.664	343
GC5B168	GC5H30	41.779	28.885	1.238
GC5B204	GC5H13	5.090	390	212
GC5B236	GC5H57	78.546	1.442	192
GC5B252	GC5H42	22.010	1.498	204
GC5B292	GC5H37	63.366	1.872	480
GC5B320	GC5H58	63.345	22.891	231
GC5B332	GC5H35	106.515	13.348	253
GC5B25	GC5H18	22.079	705	431
GC5B69	GC5H17	1.593	851	284
GC5B81	GC5H40	62.756	9.986	288
GC5B89	GC5H39	31.613	1.068	251
GC5B113	GC5H75	66.475	550	323
GC5B121	GC5H33	35.493	3.061	299
GC5B205	GC5H13	63.610	25.199	260
GC5B237	GC5H57	2.579	267	248
GC5B285	GC5H14	81.405	19.870	225

ID proteina	ID peptide HC	MFI GPRC5D cyno	MFI GPRC5D umano	MFI 293F
GC5B369	GC5H84	16.241	559	252
	TF7M1636	956	2.621	1.538
	umano 2°	209	316	228
	anti hGPRC5D	9.001	379	70
	anti-isotipo topo	60	82	65
	non colorato	44	50	33

Il profilo di legame dipendente dalla concentrazione di ciascuno degli mAb selezionati contro le cellule HEK293 che esprimono GPRC5D umano e le cellule HEK293 non trasfettate è stato determinato usando FACS (Fig. 1). È stato osservato che tutti i mAb si legano al GPRC5D umano in modo dose-dipendente. È stato anche osservato che tre mAb, GC5B36, GC5B168 e GC5B205 si legavano alle cellule HEK293 non trasfettate (GPRC5D null) e sono stati declassati a causa di questa interazione non specifica con le cellule.

I restanti 14 mAb sono stati selezionati per la generazione di anticorpi bispecifici con un braccio anti-CD3 CD3B219 e un braccio anti-RSV null B23M46 (Tabella 10).

Tabella 10: relazione tra gli ID di mAb GPRC5D e gli ID bispecifici

ID proteina mAb GPRC5D	x ID bispecifico CD3	x ID bispecifico B23Null
GC5B320	GCDB44	GCDB30
GCSB243	GCDB40	GCDB26

ID proteina mAb GPC5D	x ID bispecifico CD3	x ID bispecifico B23Null
GC5B285	GCDB43	GCDB29
GC5B332	GCDB45	GCDB31
GC5B164	GCDB35	GCDB21
GC5B251	GCDB41	GCDB27
GC5B81	GCDB32	GCDB18
GC5B235	GCDB38	GCDB24
GCSB110	GCDB34	GCDB20
GCSB202	GCDB36	GCDB22
GCSB234	GCDB37	GCDB23
GC5B252	GCDB42	GCDB28
GC5B236	GCDB39	GCDB25
GC5B89	GCDB33	GCDB19

Un anticorpo bispecifico, GCDB38, precipitava durante la ricombinazione e un altro, GCDB36, conteneva >10% di aggregato. Tutti gli altri anticorpi bispecifici hanno superato i criteri di rilascio standard e gli anticorpi bispecifici con braccio null sono stati analizzati per il legame concentrazione dipendente alle cellule HEK293 che esprimono GPRC5D umane (Fig. 2).

È stato osservato che tutti gli anticorpi bispecifici si legano in modo dose-dipendente. GC5B320 è stato incluso come comparatore di legame per comprendere le differenze di legame tra mAb bivalenti e anticorpi bispecifici monovalenti. GCDB44 è stato incluso come comparatore di legame per comprendere le differenze di legame tra gli anticorpi bispecifici anti-CD3 e gli

anticorpi monoclonali con braccio anti-RSV null. La prevista diminuzione dell'affinità di legame apparente è stata osservata confrontando l'mAb GC5B320 con gli anticorpi bispecifici GCDB30 e GCDB44. In aggiunta, è stato osservato che il GCDB44 (Ab bispecifico anti-CD3) ha un'affinità di legame leggermente più elevata con le cellule anti-GPRC5D umano in confronto al GCDB30 (Ab bispecifico con braccio anti-RSV null), dimostrando che il braccio anti-CD3 è positivamente influenzato dal legame con questa linea di cellule.

Il pannello di anticorpi bispecifici è stato anche sottoposto a profilazione per il legame contro le cellule MM1R e H929, che esprimono endogenamente GPRC5D (Fig. 3). Il profilo di legame degli anticorpi bispecifici sulle cellule MM1R e H929 è stato confrontato con le cellule HEK293 GPCR5D umano sovraespresso e con le cellule HEK293 non trasfettate usando FACS. È stato osservato che gli anticorpi bispecifici si legano al GPCR5D espresso endogenamente sulle cellule MM1R e H929 con un intervallo di affinità. Il legame più elevato è stato osservato nelle cellule umane HEK GPCR5D che, in quanto linea di cellule stabile sovraespressa, ha una densità recettoriale molto più elevata di quella delle cellule MM1R o H929. GCDB37, GCDB38, GCDB39 e GCDB41 non sono stati fatti avanzare a causa della bassa affinità di legame osservata per le cellule H929 e MM1R.

Citotossicità dipendente dalle cellule T *in vitro*

Il pannello di anticorpi bispecifici è stato quindi sottoposto a profilazione per la potenza in un saggio di citotossicità mediata dalle cellule T usando cellule bersaglio H929 e MM1R (Fig. 4 A e B, Tabella 11). In breve, le cellule bersaglio (H929, MM1.R, OPM2, LP-1 e Daudi o cellule progenitrici HEK e cellule HEK+GPRC5D) sono state contate e 10 milioni di cellule sono state centrifugate a 1350 giri/min per 3 minuti e i pellet di cellule sono stati risospesi in 1 ml di

soluzione CFSE diluita (la colorazione per la proliferazione CFSE CellTrace è stata ricostituita in 18 µl di DMSO sterile e 1 µl della soluzione è stata diluita in 10 ml di PBS sterile e incubata a temperatura ambiente per 8 minuti al buio. Dopo l'incubazione, 1 ml di HI FBS è stato aggiunto alla sospensione di cellule per eliminare il CFSE in eccesso. Le cellule sono state lavate due volte in RPMI-1640 con il 10% di FBS. Dopo la ricostituzione in 10 ml di RPMI, le cellule sono state contate e la loro vitalità è stata registrata in un foglio di calcolo. Le cellule sono state diluite a $2,2 \times 10^5/\text{ml}$ e incubate a 37 °C fino all'uso.

Le cellule Pan T da donatori normali sono state scongelate in un bagno d'acqua a 37 °C e le cellule sono state quindi centrifugate a 1350 giri/min a 4 °C per 3 minuti. I surnatanti sono stati scartati e ricostituiti nel mezzo di coltura alla concentrazione di $1,1 \times 10^6/\text{ml}$. Sono state aggiunte 2×10^5 cellule bersaglio nei pozzetti di una piastra a fondo U da 96 pozzetti, seguite dal bloccante dell'Fc (fino alla concentrazione finale di 2 mg/ml). Tutte le linee di cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 10 minuti per bloccare l'attività del recettore Fc. 1×10^5 cellule T sono state aggiunte nei pozzetti (5:1 rapporto Effettore: Bersaglio). Dopo che le cellule bersaglio e T sono state miscelate, sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 20 µl di diluizioni di Ab bispecifico GPRC5D x CD3. Gli anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 sono stati diluiti a 800 µg/ml (10X) in PBS. La titolazione è stata preparata in diluizioni seriali di 4 volte in PBS in una piastra a 96 pozzetti con fondo a U. L'ultima colonna è stata lasciata come solo PBS (controllo veicolo). Le piastre sono state incubate a 37 °C con 5% di CO₂ per 48 ore.

Due giorni più tardi (48 ore), le piastre sono state centrifugate e 100 µl di surnatanti sono stati conservati a -80 °C per il saggio di rilascio delle citochine. Le cellule sono state lavate in 200 µl di PBS e incubate in 50 µl di colorante

Live/Dead near-IR (diluizione 1:200) e anticorpo anti-CD25 PE (diluizione 1:50) per 20 minuti a temperatura ambiente. Quindi, le cellule sono state lavate una volta in 200 μ l di tampone FACS e infine ricostituite in 150 μ l di tampone FACS. Le cellule sono state analizzate usando FACSCanto II e FlowJo 7.6 per la citotossicità bersaglio (% bersaglio) e l'attivazione delle cellule T CD25+ (% cellule T vive). La rappresentazione grafica e l'adattamento dei dati sono stati eseguiti in GraphPad Prism 6 usando la funzione di regressione non lineare con pendenza variabile (quattro parametri) usando il metodo dei minimi quadrati.

Tabella 11: EC₅₀ media calcolata dalla valutazione della citotossicità mediata dalle cellule T degli anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 usando cellule bersaglio H929 e MM1R

GPRC5D x CD3 EC₅₀ (nM)			
ID bispecifico	H929 (n= 5)	MM1R (n = 3)	Classifica (media) H929/MM1R
GCDB32	0,39 $\pm$ 0,3	0,12 $\pm$ 0,1	2/1
GCDB33	4,29 $\pm$ 1,28	0,8 $\pm$ 0,18	7/6
GCDB34	2,13 $\pm$ 0,93	0,77 $\pm$ 0,24	5/5
GCDB35	1,39 $\pm$ 0,84	0,74 $\pm$ 0,32	4/4
GCDB36	5,2 $\pm$ 0,93	4,22 $\pm$ 0,55	8/9
GCDB40	1,2 $\pm$ 0,92	0,52 $\pm$ 0,38	3/3
GCDB41	NA	2,58 $\pm$ 0,15	10/8
GCDB43	0,36 $\pm$ 0,41	0,21 $\pm$ 0,29	1/2
GCDB44	10,29 $\pm$ 2,65	4,41 $\pm$ 0,29	9/10
GCDB45	2,25 $\pm$ 1	0,91 $\pm$ 0,93	6/7

Tutti gli anticorpi bispecifici sono attivi nell'uccisione delle cellule H929 mediata dalle cellule T, con un intervallo di potenze osservate (Tabella 11). È stato osservato un ordine di classificazione simile per entrambe le linee di cellule. Tuttavia una EC_{50} inferiore è stata osservata nelle cellule MM1R. È interessante notare che l'affinità di legame non era necessariamente correlata alla potenza nel saggio di citotossicità mediata dalle cellule T. Per esempio, GCDB44 era l'anticorpo bispecifico con la più alta affinità di legame, ma il meno potente nel saggio di citotossicità. Mentre il GCDB43, con un'affinità di legame simile, anche se leggermente inferiore, era il più potente nel saggio di citotossicità.

Per valutare la reattività crociata funzionale con cyno GPRC5D, il pannello di anticorpi bispecifici è stato quindi sottoposto a profilazione per la citotossicità mediata dalle cellule T e l'attivazione delle cellule T usando cellule HEK293 cyno GPRC5D (Fig. 5A e B). Tutti gli anticorpi bispecifici erano attivi in questo saggio, sebbene sia stato osservato un intervallo di potenza contro le cellule che esprimevano cyno GPRC5D+.

Efficacia *in vivo*

Un studio di valutazione *in vivo* è stato quindi completato per comprendere la potenza *in vivo* di questi anticorpi bispecifici GPRC5D X CD3. GCDB32 e GCDB35 (Fig. 5 A e B) sono stati selezionati per essere sottoposti a prova in un modello di tumore profilattico H929. Le cellule H929 sono state impiantate nei topi NSG, una settimana dopo l'iniezione di PBMC umane. Il trattamento degli anticorpi bispecifici è stato iniziato contemporaneamente all'impianto delle cellule H929 ed è continuato ogni 2 o 3 giorni (q2d o q3d) a dosi di 10 ug, 1 ug e 0,1 ug/animale per un totale di cinque trattamenti. Sono stati usati dieci topi in ciascun gruppo e il PBS è stato incluso come veicolo controllo. Il trattamento è stato arrestato il giorno

11 e lo studio è stato terminato il giorno 25 (Fig. 6 A e B) o il giorno 26 (Fig. 12 A-D). Tutti gli anticorpi GPRC5D x CD3 sottoposti a prova in questo modello profilattico hanno mostrato un'inibizione della crescita del tumore del 100% alla dose di 10 e 1 ug/animale, ad eccezione di GCDB35 che ha mostrato un'inibizione della crescita del tumore intorno all'80% alla dose di 1 ug/animale. A dosi dieci volte inferiori (0,1 ug/animale), questi anticorpi bispecifici hanno mostrato un grado variabile di efficacia che varia dal 10 all'80% di inibizione della crescita del tumore.

Citotossicità dipendente dalle cellule T *in vitro* in presenza di bloccante di Fc

Per comprendere la specificità del braccio di bersagliamento di GPRC5D, il pannello di anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 è stato quindi esaminato in un saggio di citotossicità di reindirizzamento delle cellule T in presenza di blocco di Fc. Questo esperimento è stato fondamentale per comprendere la specificità in quanto le cellule bersaglio per gli anticorpi bispecifici sono le cellule B che esprimono i recettori per Fcγ capacità di interagire con la porzione Fc dell'anticorpo bispecifico nel saggio *in vitro*. È stato osservato uno spostamento nella potenza nel saggio di citotossicità mediata dalle cellule T per un certo numero di anticorpi bispecifici, con lo spostamento maggiore osservato per GCDB40 e GCDB34 (Fig. 7A-7B).

È stata quindi completata la misurazione diretta delle interazioni di legame tra i quattro anticorpi bispecifici più potenti (GCDB32, GCDB35, GCDB40 e GCDB43) e recettori di Fcγ (Fig. 8A-8D). È stato compiuto un ciclo di analisi Alpha Screen per ciascuno dei recettori di Fcγ e anticorpi bispecifici elencati sopra. I campioni sono stati sottoposti a saggio in duplicato. Su FcγRI, i quattro anticorpi bispecifici si comportano come B21M hIgG4 PAA. Ovvero, non sono più competitivi del controllo isotipico abbinato. Differenze simili sono state osservate

anche tra il controllo hIgG1 WT e i quattro anticorpi bispecifici su FcγRIIIa, con GCD43 più simile al controllo isotipico IgG4PAA e gli altri anticorpi bispecifici che hanno un'affinità leggermente superiore per FcγRIIIa. Su entrambi i FcγRIIa e FcγRIIb, i quattro anticorpi bispecifici competono nel seguente ordine: GCDB40 > GCDB32 > GCDB43 > GCDB35. GCDB40 è il più competitivo o si lega con la massima affinità a FcγRIIa e FcγRIIb. Infatti GCDB40 compete su FcγRIIa e FcγRIIb nella stessa misura di hIgG1 WT, corroborando lo spostamento di potenza osservato nel saggio di citotossicità mediata dalle cellule T quando è stato incluso il blocco di Fc. A causa delle interazioni inaspettate con FcγRIIa e FcγRIIb, GCDB40 non era avanzato.

Saggio di binning competitivo

Gli anticorpi monoclonali anti-GPRC5D sono stati esaminati per il legame competitivo tra loro e con le cellule GPCR5D umane. In breve, le cellule sono state piastrate a 50.000 cellule/pozzetto in 50 µl di mezzo e lasciate depositare per 90 minuti a 37 °C. I pozzetti sono stati quindi bloccati usando BSA al 3% per 1 ora a temperatura ambiente. I mAb sono stati tracciati con rutenio(II) tris-bipiridina, N-idrossisuccinimide (tracciante Ru) seguendo le procedure standard. In una piastra separata da 96 pozzetti, 5 µM di mAb competitore sono stati incubati con 50 µM di mAb tracciato con Ru. La soluzione bloccante è stata rimossa dalla piastra delle cellule e sono stati aggiunti 25 µl di soluzione di mAb. Le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con agitazione. Dopo aver lavato le piastre tre volte con PBS, sono stati aggiunti 150 µl di tampone di lettura MSD (senza tensioattivo) e il legame dell'anticorpo tracciato con Ru è stato rilevato usando un lettore di piastre MSD.

Tutti gli mAb appartengono allo stesso gruppo di competizione, con solo

GC5B420 e GC5B421 non completamente competitivi con GC5B81, GC5B285 e/o GC5B332 (bloccati < 70%) (Tabella 12). Si ipotizza che il legame simultaneo di due mAb a GPRC5D possa essere stericamente impossibile, date le piccole dimensioni del dominio extracellulare di GPRC5D in confronto alle dimensioni di un mAb.

Tabella 12: binning di epitopi di legame competitivo dei mAb anti-GPRC5D. I mAb anti-GPRC5D sono stati esaminati per il legame competitivo tra loro e con le cellule GPCR5D umane (+/- = bloccati < 70%)

ID di mAb	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	+	+	+	+	+/-	+/-
GC5B164	+	+	+	+	+	+
GC5B285	+	+	+	+	+	+/-
GC5B332	+	+	+	+	+/-	+
GC5B420	+	+	+	+	+	+
GC5B421	+	+	+	+	+	+
GC5B243	+	+	+	+	+	+

Esempio 4: generazione di anticorpi GPRC5D usando la tecnologia degli ibridomi

Tre topi Balb/c sono stati immunizzati per via intradermica alla base della coda con il DNA plasmidico pCMV6-neo (promotore CMV) che esprimeva GPRC5D umano a lunghezza intera i giorni 0, 10 e 20. I topi hanno ricevuto le immunizzazioni intraperitoneali e endovenose finali il giorno 59 con cellule della leucemia basofila del ratto (RBL, Rat Basophilic Leukemia) che sovraesprimono

GPRC5D umano a lunghezza intera. Il giorno 63, sono stati prelevati i linfonodi e le milze, è stato svolto l'arricchimento delle cellule B e le cellule sono state usate per generare ~3500 ibridomi secernenti mAb.

Esempio 5: caratterizzazione iniziale degli anticorpi GPRC5D ottenuti attraverso la tecnologia degli ibridomi

Legame a GPRC5D

Gli ibridomi sono stati vagliati usando FACS per il legame sia alle cellule RBL che alle RBL che esprimono GPRC5D umano. È stato calcolato il rapporto tra l'MFI di fondo aggiustato di ciascun legame del mAb alle cellule GPRC5D_RBL in relazione alle cellule RBL non trasfettate e qualsiasi campione con un rapporto di legame maggiore di 3 è stato considerato potenzialmente positivo. Novantanove ibridomi avevano un rapporto maggiore di 3 e sono stati fatti avanzare per la clonazione regione v. Sono state identificate, sintetizzate, espresse e purificate sequenze di trentuno mAb. Due dei 31 mAb hanno presentato un legame con le cellule RBL_GPRC5D al di sopra dello sfondo (Fig. 9A e 8B). GCDB390 e GCDB396 sono stati selezionati per l'espressione, la purificazione e la generazione di anticorpi bispecifici con il braccio anti-CD3 CD3B219 per generare rispettivamente gli anticorpi bispecifici GCDB46 e GCDB47.

Citotossicità dipendente dalle cellule T

GCDB46 e GCDB47 sono stati esaminati nel saggio di citotossicità mediata dalle cellule T (Fig. 10A e 10B). È stato osservato che entrambi gli anticorpi bispecifici sono potenti, con EC_{50} riportato rispettivamente di 0,67 e 0,1 nM. Sulla base di questi dati, entrambi i mAb sono stati fatti avanzare per l'ottimizzazione di lead insieme ai tre mAb derivati dai fagi.

Esempio 6: valutazione, selezione e ottimizzazione di HiT

Sono stati selezionati cinque anticorpi bispecifici GPRC5D per l'ottimizzazione di lead (GCDB32, GCDB43, GCDB35, GCDB46, GCDB47) in base ai dati di legame, funzione, reattività crociata e selettività riepilogati nella Tabella 13.

Tabella 13: dati di ottimizzazione di lead per gli anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3. Sono stati esaminati gli anticorpi bispecifici per legame, funzione, reattività crociata e selettività

ID GPRC5D x CD3	Selettività	Uccisione delle cellule bersaglio mediata dalle cellule T			
	Legame a GPRC5A, B, C	H929 EC50 $\pm$ DS (nM)	MM1R EC50 $\pm$ DS (nM)	H929 Nessun blocco Fc vs Fc	EC50 (nM) per Cyno GPRC5D
GCDB32	Nessun legame	0,43 $\pm$ 0,29	0,12 $\pm$ 0,01	2,4	0,19
GCDB43	Nessun legame	0,39 $\pm$ 0,07	0,54	2,8	0,95
GCDB40	Nessun legame	1,2 $\pm$ 0,83	0,52 $\pm$ 0,31	5,1	10,61
GCDB35	Bassa	1,39 $\pm$ 0,75	0,74 $\pm$ 0,26	2,7	4,65
GCDB34	Nessun legame	2,01 $\pm$ 0,74	0,77 $\pm$ 0,09	6,3	1,14
GCDB45	Nessun legame	2,36 $\pm$ 0,84	0,91 $\pm$ 0,76	2,2	2,82
GCDB33	Nessun legame	5,21 $\pm$ 1,21	0,8 $\pm$ 0,15	1,5	0,2
GCDB36	Bassa	5,57 $\pm$ 0,47	4,22 $\pm$ 0,29		3,35
GCDB46	Nessun legame	0,67			

ID	Selettività	Uccisione delle cellule bersaglio mediata dalle cellule T			
		H929 EC50 $\pm$ DS (nM)	MM1R EC50 $\pm$ DS (nM)	H929 Nessun blocco Fc vs Fc	EC50 (nM) per Cyno GPRC5D
GPRC5D x CD3	Legame a GPRC5A, B, C				
GCDB47	Nessun legame	0,1			
GCDB48	Nessun legame	0,17			Non attivo

L'ottimizzazione di lead è stata volta ad affrontare i potenziali rischi di sequenza di modifica post-traduzionale (PTM) per GCDB32 (mAb progenitore GC5B81), GCDB43 (mAb progenitore GC5B285) e GCDB35 (mAb progenitore GC5B164) come descritto nella Tabella 14.

Tabella 14: affidabilità di potenziale sequenza di mitigazione PTM per hit derivati da Fago. Le sequenze di Hc CDR sono mostrate con le affidabilità di potenziale sequenza PTM sono sottolineate

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)				
ID	ID He	He CDR1	Hc CDR2	HcCDR3
GPRC5D	GPRC5D			
GC5B81	GC5H40	SYAIS (1)	GIIPFGTANYAQKFQG (5)	ESRWRGYKLD (9)
GC5B285	GC5H14	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAWDFGRRA VRLDY (30)
GC5B164	GC5H36	SYWIG (27)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)

Tutte le varianti PTM sottoposte a saggio per GC5B81 avevano una sostanziale riduzione dell'affinità di legame, dimostrando la criticità di questo residuo (HC W102) per il paratopo (Tabella 15).

Tabella 15: Sequenze di CDR e dati di legame della libreria PTM GC5B81. Il sito della mutazione è sottolineato. Il legame è stato classificato come MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPRC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	He CDR3	GPRC5D umano (FACS)
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRYRGYKLDY- (31)	
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRVRGYKLDY- (32)	
GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRGRGYKLDY- (33)	
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRARGYKLDY- (34)	
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRFRGYKLDY- (35)	

Gli studi di legame hanno identificato una serie di mutazioni sia per GC5B285 che per GC5B164 che hanno mantenuto il legame con GPRC5D umano (Tabelle 16 e 17).

Tabella 16: sequenze di CDR e dati di legame della libreria PTM GC5B164. Il sito della mutazione è sottolineato. Il legame è stato classificato come MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPRC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	He CDR3	legame di GPR5D umano (FACS)
GC5B471	GC5H278	D55A, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B472	GC5H277	D55A, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B473	GC5H276	D55A, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B474	GC5H275	D55A, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B475	GC5H274	D55A, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B476	GC5H273	D55S, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B477	GC5H272	D55S, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B478	GC5H271	D55S, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B479	GC5H270	D55S, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B480	GC5H269	D55S, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B481	GC5H268	D55K, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B482	GC5H267	D55K, W33V	SY <u>V</u> IG (37)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B483	GC5H266	D55K, W33F	SY <u>F</u> IG (3)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B484	GC5H265	D55K, W33G	SY <u>G</u> IG (38)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B485	GC5H264	D55K, W33A	SY <u>A</u> IG (39)	IIYPG <u>K</u> SDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B486	GC5H263	D55E, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	He CDR3	legame di GPC5D umano (FACS)
GC5B487	GC5H262	D55E, W33V	SYVIG (37)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B488	GC5H261	D55E, W33F	SYFIG (3)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B489	GC5H260	D55E, W33G	SYGIG (38)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B490	GC5H259	D55E, W33A	SYAIG (39)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B491	GC5H258	D55Y, W33Y	SY ^Y IG (36)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B492	GC5H257	D55Y, W33V	SY ^V IG (37)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B493	GC5H256	D55Y, W33F	SY ^F IG (3)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B494	GC5H255	D55Y, W33G	SY ^G IG (38)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B495	GC5H254	D55Y, W33A	SY ^A IG (39)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B496	GC5H253	W33Y	SY ^Y IG (36)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B497	GC5H252	W33V	SY ^V IG (37)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B498	GC5H251	W33F	SY ^F IG (3)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B499	GC5H250	W33G	SY ^G IG (38)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B500	GC5H249	W33A	SY ^A IG (39)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B501	GC5H248	D55A	SYWIG (27)	IIYPGAS DTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B502	GC5H247	D55S	SYWIG (27)	IIYPGSS DTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPRC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	He CDR3	legame di GPR5D umano (FACS)
GC5B503	GC5H246	D55K	SYWIG (27)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B504	GC5H245	D55E	SYWIG (27)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B505	GC5H244	D55Y	SYWIG (27)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

Tabella 17: sequenze di CDR e dati di legame della libreria PTM

GC5B285. Il sito della mutazione è sottolineato. Il legame è stato classificato come MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPRC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	Hc CDR3	GPRC5D umano (FACS)
GC5B463	GC5H234	D62A, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAASVKG (44)	AA ^Y DFGRRVRLDY (48)	+
GC5B432	GC5H228	D62S, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AA ^V DFGRRVRLDY (49)	+
GC5B465	GC5H227	D62S, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AA ^F DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B433	GC5H223	D62K, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AA ^V DFGRRVRLDY (49)	+
GC5B434	GC5H222	D62K, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AA ^F DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B435	GC5H219	D62E, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AA ^Y DFGRRVRLDY (48)	+
GC5B436	GC5H217	D62E, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AA ^F DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B461	GC5H216	D62E, W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AA ^G DFGRRVRLDY (50)	-

(Gli ID di SEQ n. per ciascuna sequenza elencata sono forniti in parentesi)						
ID GPRC5D	ID di catena pesante	Mutazione	He CDR1	He CDR2	Hc CDR3	GPRC5D umano (FACS)
GC5B462	GC5H215	D62E,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	+
GC5B437	GC5H214	D62Y,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	+
GC5B438	GC5H213	D62Y,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	+
GC5B439	GC5H212	D62Y,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	+
GC5B440	GC5H211	D62Y,W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY (50)	-
GC5B441	GC5H210	D62Y,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	+
GC5B442	GC5H209	W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	+
GC5B443	GC5H208	W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	+
GC5B444	GC5H207	W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	+
GC5B464	GC5H206	W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY (50)	+
GC5B445	GC5H205	W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY (51)	+
GC5B446	GC5H204	D62A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (44)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B447	GC5H203	D62S	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVKG (6)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B448	GC5H202	D62K	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B449	GC5H201	D62E	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B450	GC5H200	D62Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>W</u> DFGRRAVRLDY (30)	+

Sulla base di questi dati di legame, sono stati generati mAb selezionati come anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 e esaminati per la citotossicità mediata dalle cellule T delle cellule H929 (Tabella 18).

Tabella 18: attività funzionale di varianti GPRC5D PTM selezionate per GCDB164 e GCDB285

ID di mAb GPRC5D progenitore	ID di AA di proteina GPRC5D	ID GPRC5D x CD3	EC ₅₀ (nM) di H929	Selezionato come lead
GC5B285	GC5B432	GCDB50	1,3	
	GC5B433	GCDB51	0,81	
	GC5B434	GCDB52	2,81	
	GC5B465	GCDB53	0,24	XX
	GC5B463	GCDB54	3,09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3,87	
	GC5B476	GCDB58	1,24	
	GC5B478	GCDB59	1,54	
	GC5B481	GCDB60	2,94	
	GC5B483	GCDB61	1,51	XX
	GC5B493	GCDB62	3,1	

Nel saggio di citotossicità mediata dalle cellule T è stato osservato un intervallo di potenza che non era necessariamente previsto dall'affinità di legame osservata. Per esempio, GC5B465 e GC5B463 legati con affinità simile al GPRC5D umano differiscono solo nella sequenza di 2 amminoacidi (Tabella 17) e si è osservato che avevano una differenza di potenza di 12,5 volte rispetto agli anticorpi

bispecifici GPRC5D x CD3 (Tabella 18). Sulla base dei dati funzionali, GC5B465 e GC5B483 sono stati selezionati come sequenze ottimizzate per GC5B285 (GCDB43 come CD3 bispecifico) e GC5B164 (GCDB35 come CD3 bispecifico).

È stato completato anche l'adattamento della cornice umana per gli mAb GPCR5D derivati dall'ibridoma murino (GC5B390 e GC5B396, o GCDB46 e 47 come CD3 bispecifici, rispettivamente). Gli studi di legame hanno identificato una serie di cornici per GC5B396 e una cornice per GC5B390 che hanno mantenuto il legame con GPRC5D umano (Tabella 19).

Tabella 19: dati di legame e funzionali per l'adattamento della cornice umana delle librerie di mAb anti-GPRC5D derivati da ibridomi. Il legame è stato classificato come MFI >10.000 = +++; MFI >5.000 = ++; MFI > 1.000 = +; MFI <1.000

ID di mAb progenitore GPRC5D	GPRC5D mAb AA ID	ID di catena pesante	ID di catena leggera	GPRC5D umano (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GPRC5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	+		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	+++	GCDB69	0,58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	++		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	++		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	+		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	+++	GCDB68	2,51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	+		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	++		
	GC5B533	GC5H241	GC5L56	+		
	GC5B532	GC5H240	GC5L56	+++	GCDB67	0,61
	GC5B531	GC5H242	GC5L56	++		

ID di mAb progenitore GPRC5D	GPRC5D mAb AA ID	ID di catena pesante	ID di catena leggera	GPRC5D umano (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
	GC5B530	GC5H243	GC5L56	+++	GCDB66	1,41
	GC5B529	GC5H241	GC5L55	++		
	GC5B528	GC5H240	GC5L55	+++	GCDB65	1,01
	GC5B527	GC5H242	GC5L55	-		
	GC5B526	GC5H243	GC5L55	++	GCDB64	1,5
GPRC5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	-		
	GC5B524	GC5H237	GC5L53	-		
	GC5B523	GC5H238	GC5L53	-		
	GC5B522	GC5H236	GC5L53	-		
	GC5B521	GC5H279	GC5L52	-		
	GC5B520	GC5H237	GC5L52	-		
	GC5B519	GC5H238	GC5L52	-		
	GC5B518	GC5H236	GC5L52	-		
	GC5B517	GC5H279	GC5L51	+		
	GC5B516	GC5H237	GC5L51	+		
	GC5B515	GC5H238	GC5L51	++	GCDB63	0,52
	GC5B514	GC5H236	GC5L51	+		
	GC5B513	GC5H279	GC5L50	-		
	GC5B512	GC5H237	GC5L50	+		
	GC5B511	GC5H238	GC5L50	+		
	GCSB510	GC5H236	GC5L50	+		
	GC5B509	GC5H279	GC5L49	-		
	GC5B508	GC5H237	GC5L49	+		
	GC5B507	GC5H238	GC5L49	+		
	GC5B506	GC5H236	GC5L49	+		

Sulla base dei dati di legame sono stati generati svariati mAb anti-GPRC5D come anticorpi bispecifici CD3 e esaminati per la citotossicità mediata dalle cellule T delle cellule H929 (Tabella 18). L'analisi funzionale ha identificato GCDB63, GCDB67 e GCDB69 come potenti anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 interamente umanizzati. Sulla base di questi dati, i corrispondenti mAb anti-GPRC5D, GC5B515, GC5B532 e GC5B540, sono stati selezionati come sequenze interamente umanizzate per GCSB390 e GC5B391.

È stata quindi completata un'ottimizzazione di lead aggiuntiva delle sequenze interamente umanizzate, volta ad affrontare i potenziali rischi di sequenza di modificazione post-traduzionale GC5B515, GC5B532 e GCDB540. È stata generata una mutazione G56S nella sequenza della catena pesante per rimuovere un potenziale rischio di deamidazione per GC5B515 (Tabella 20).

Tabella 20: attività di legame e funzionale di varianti selezionate di GPRC5D PTM per GC5B532, GC5B540 e GCDB515

ID di mAb progenitore GPRC5D	GPRC5D mAb AA ID	Mutazione	GPRC5D umano (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GC5B540	GC5B590	M64K	+++		
	GC5B592	G99A	+		
	GC5B594	M64K, G99A	+		
GC5 B532	GC5B591	M64K	+++		
	GC5B593	G99A	+		
	GC5B595	M64K, G99A	+		

ID di mAb progenitore GPRC5D	GPRC5D mAb AA ID	Mutazione	GPRC5D umano (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GC5 B515	GC5B596	G56S	++	GCDB72	0,15

Le catene pesanti di GC5B532 e GC5B540 presentavano sia un potenziale rischio di isomerizzazione che di ossidazione. Per ridurre questo rischio sono state generate le mutazioni M64K e G99A (Tabella 20). Tutte le varianti sottoposte a prova con la mutazione G99A hanno mostrato una riduzione sostanziale dell'affinità di legame, mentre le varianti M64K e G56A non sono state interessate. Sulla base dei dati di legame, GC5B596 da solo è stato fatto progredire per esame funzionale e ha dimostrato potenza come CD3 bispecifico (GCDB72) nei saggi di citotossicità mediata dalle cellule T.

Dunque, sono stati selezionati quattro mAb bispecifici GPRC5D per una caratterizzazione aggiuntiva: GCDB32, GCDB53, GCDB61 e GCDB72. Di seguito, nelle tabelle 21 e 22, sono raffigurate le sequenze di CDR e delle catene pesanti e leggere degli anticorpi monoclonali GPRC5D usate per la generazione delle molecole bispecifiche.

Tabella 21. Sequenze di CDR di 4 candidati mAb GPRC5D che hanno mostrato legame con GPRC5D umano e cyno e che erano funzionali quando generati come CD3 bispecifici

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (ID di SEQ n. 1)	GIIPFGTANY AQKFQG (ID di SEQ n. 5)	ESRWRGYKLD (ID di SEQ n. 9)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)
GC5B465	NYWMS (ID di SEQ n. 2)	GISYSGGSKY YASSVKG (ID di SEQ n. 6)	AAFDGRRRAV RLD (ID di SEQ n. 10)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B483	SYFIG (ID di SEQ n. 3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (ID di SEQ n. 7)	VYSFGGRHKA LFDY (ID di SEQ n. 11)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B596	GYTMN (ID di SEQ n. 4)	LINPYNSDTN YAQKLQG (ID di SEQ n. 8)	VALRVALDY (ID di SEQ n. 12)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)

Tabella 22: sequenze della regione variabile della catena pesante e leggera di 4 candidati mAb GPRC5D che hanno mostrato legame contro GPRC5D umano e cyno e che erano funzionali quando generate come CD3 bispecifici

ID AA di mAb	Sequenza di amminoacidi di VH	ID di SEQ n.	Sequenza di amminoacidi di VL	ID di SEQ n.
GC5B81	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIPI FGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARESRWRGYKLD YWGQGTLVTVSS	52	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLT TITSLQPEDFATYYCQQSY S TPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B465	EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSNYWMS WVRQAPGKGLEWVSGIS YSGGSKYYASSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKAADFGR RAVRLDYWGQGTSLTVS S	53	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLT TITSLQPEDFATYYCQQSY S TPLTFGQGTKVEIK	56

ID AA di mAb	Sequenza di amminoacidi di VH	ID di SEQ n.	Sequenza di amminoacidi di VL	ID di SEQ n.
GC5B483	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYFIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPG KSDTRYSPSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVYSFGGRHKA LFDYWGQGTLVTVSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRN WPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B596	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYSFTGYTM NWVRQAPGQGLEWMGLI NPYNSTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARVALRV ALDYWGQGTLVTVSS	55	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCKASQNVATHVGW YQQKPGKAPKRLIYSASY RYSQVPSRFSGSGSGTEFT LTISNLPEDFATYYCQQ YNRYPTYTFGQGTKLEIK	58

Esempio 7: preparazione di anticorpi GPRC5D e CD3 in un formato bispecifico in IgG4 S228P, L234A, L235A

I quattro anticorpi monospecifici GPRC5D (si veda tabella 21) sono stati espressi come IgG4, con le sostituzioni S228P, L234A e L235A o S228P, L234A, L235A, F405L e R409K Fc (braccio CD3) (numerazione secondo l'indice EU). È stato generato anche un anticorpo anti-CD3 monospecifico CD3B219 comprendente le regioni VH e VL aventi la catena pesante di ID di SEQ n. 25 e una catena leggera di ID di SEQ n. 26 e regione costante di IgG4 con sostituzioni S228P, L234A, L235A, F405L, e R409K.

Gli anticorpi monospecifici sono stati espressi e purificati usando metodi standard usando una colonna di proteina A (colonna HiTrap MabSelect SuRe). Dopo l'eluizione, i pool sono stati dializzati in D-PBS, pH 7,2.

Anticorpi GPRC5D x CD3 bispecifici sono stati generati combinando un mAb CD3 monospecifico e un mAb GPRC5D monospecifico in uno scambio di braccio Fab *in vitro* (come descritto in WO2011/131746). In breve, a circa 1-20 mg/ml a un rapporto molare di 1,08:1 di anticorpo anti-GPRC5D/anti-CD3 in PBS, pH 7-7,4 e 2-mercaptoetanalammina (2-MEA) 75 mM sono stati miscelati assieme e incubati a 25-37 °C per 2-6 ore, seguite dalla rimozione della 2-MEA tramite dialisi, diafiltrazione, filtrazione a flusso tangenziale e/o filtrazione centrifugazione di cellule usando metodi standard.

Le catene pesante e leggera per gli anticorpi bispecifici GPRC5D × CD3 sono mostrate nel seguito nella Tabella 23.

Tabella 23. sequenze di catene pesante e leggera per anticorpi bispecifici IgG4-PAA

Ab		Sequenza di amminoacidi
GCDB32	Catena pesante 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSS
	Catena leggera 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLTG VQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	Catena pesante 2 GC5B81 (ID di SEQ n. 52)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDVAVYYCARESRWRGYKLDYWGGQGLVTVSS

Ab		Sequenza di amminoacidi
	Catena leggera 2 GC5B81 (ID di SEQ n. 56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGGTKVEIK
GCDB53	Catena pesante 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSS
	Catena leggera 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	Catena pesante 2 GC5B465 (ID di SEQ n. 53)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQ APGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDGRRVRLDYWGQGT LTVTVSS
	Catena leggera 2 GC5B465 (ID di SEQ n. 56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGQGGTKVEIK
GCDB61	Catena pesante 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK
	CD3B219 (ID di SEQ n. 25)	NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSS
	Catena leggera 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Ab		Sequenza di amminoacidi
	Catena pesante 2 GC5B483 (ID di SEQ n. 54)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGYSFTSYFIGWVRQM PGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGGQGLV TVSS
	Catena leggera 2 GC5B483 (ID di SEQ n. 57)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDF AVYYCQQRSNWPLTFGQGTEKVEIK
GCDB72	Catena pesante 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWG QGLVTVSS
	Catena leggera 1 CD3B219 (ID di SEQ n. 26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLTG VQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVL
	Catena pesante 2 GC5B596 (ID di SEQ n. 55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYNSTNYAQKLQGRVTMTTDTST TAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLVTV VSS
	Catena leggera 2 GC5B596 (ID di SEQ n. 58)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVATHVGWYQQK PGKAPKRLIYSASYRYSYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLP QPEDFATYYCQQYNRYPYTFGGQTEKLEIK

Esempio 8: caratterizzazione funzionale di GCDB32, GCDB53, GCDB61 e GCDB72

GCDB32, GCDB53, GCDB61 e GCDB72 sono stati esaminati per il legame al GPRC5D murino (Tabella 24). Tutti e quattro gli anticorpi bispecifici si sono legati al GPRC5D murino, con un intervallo di affinità di legame osservate.

Tabella 24: legame degli anticorpi anti-GPCR5D x CD3 al GPCR5D murino

ID GPCR5D x CD3	Legame FACS GPCR5D murino (MFI)
GCDB32	1151
GCDB53	2658
GCDB61	3552
GCDB72	481

La reattività crociata con cyno GPCR5D è stata esaminata anche usando il saggio di citotossicità di reindirizzamento delle cellule T su linee di cellule GPCR5D umano e cyno sovraesprese (Tabella 25). Un anticorpo bispecifico GPCR5D x CD3 era equipotente contro GPCR5D umano e cyno (GCDB32), mentre gli altri bispecifici sottoposti a prova erano meno potenti nell'indurre la citotossicità di cyno GPCR5D rispetto al GPCR5D umano.

Tabella 25: attività funzionale degli anticorpi GPCR5D x CD3 lead contro le cellule HEK che esprimono GPCR5D umano e cyno

ID GPCR5D x CD3	Cellule HEK GPCR5D umano (EC ₅₀ nM)	Cellule HEK Cyno GPCR5D (EC ₅₀ nM)
GCDB32	0,04	0,07
GCDB53	0,08	0,36
GCDB61	0,03	1,22

ID GPRC5D x CD3	Cellule HEK GPRC5D umano (EC ₅₀ nM)	Cellule HEK Cyno GPRC5D (EC ₅₀ nM)
GCDB72	0,03	3,41

Una caratterizzazione aggiuntiva è stata volta a comprendere il legame in vitro (Fig. 11A-11E) e la potenza (Tabella 26).

Tabella 26: citotossicità mediata dalle cellule T di svariate linee di cellule B umane che esprimono GPRC5D mediante anticorpi GPRC5D x CD3 lead

ID GPRC5D x CD3	EC ₅₀ nM di cellule H929 (Ordine di rango)	EC ₅₀ nM di MM1R (Ordine di rango)	EC ₅₀ nM di OPM2 (Ordine di rango)	EC ₅₀ nM di LP-1 (Ordine di rango)
GCDB32	0,45 (3)	0,04 (1)	0,98 (2)	1,02 (2)
GCDB53	0,69 (4)	0,28 (4)	2,83 (4)	1,58 (3)
GCDB61	0,39 (2)	0,06 (3)	1,46 (3)	1,67 (4)
GCDB72	0,22 (1)	0,04 (1)	0,77 (1)	0,7 (1)

Sebbene sia stato osservato un intervallo di affinità di legame, con GCDB61 come legante più forte e GCDB72 e GCDB32 come leganti più deboli, le potenze in vitro erano molto simili per il pannello di anticorpi bispecifici. Tuttavia, in base all'analisi dell'ordine di rango, GCDB72 era il più potente tra le varie linee di cellule B analizzate. Gli esperimenti di legame e potenza *ex vivo* che usano MNC derivate da pazienti hanno reso risultati simili più ampi dei saggi in vitro (Tabella 27 e Fig. 15A e 15B).

Tabella 27. Legame dell'anticorpo bispecifico GPCR5D x CD3, citotossicità mediata dalle cellule T e attivazione delle cellule T di MNC derivate da pazienti con MM

Paziente	ID AA GPCR5D x CD3	EC ₅₀ nM di legame	Citotossicità EC ₅₀ nM di citotossicità	EC ₅₀ attivazione di cellule T nM
MM303BM	GCDB32	16,1	0,36	0,18
	GCDB53	3,98	0,42	0,17
	GCDB61	5,53	0,89	0,22
	GCDB72	27,5	0,30	0,12
MM305BM	GCDB32	70,4	0,26	0,16
	GCDB53	10,2	0,26	0,19
	GCDB61	6,93	0,6	0,22
	GCDB72	65,9	0,28	0,12

GCDB61 aveva la più alta affinità di legame con le MNC dei pazienti, mentre GCDB72 e GCDB32 erano i leganti più deboli. Di nuovo, nonostante siano state osservate differenze nell'affinità di legame, tutti gli anticorpi bispecifici hanno dimostrato un'efficacia sub-nanomolare nei saggi di citotossicità reindirizzata delle cellule T. Le molecole erano praticamente indistinguibili sulla base di potenza *in vitro* e *ex vivo* tuttavia, *in vivo* i dati fornivano la differenziazione (Fig. 12A-12D).

Le cellule H929 sono state impiantate nei topi NSG, una settimana dopo l'iniezione di PBMC umane. Il trattamento degli anticorpi bispecifici è stato iniziato contemporaneamente all'impianto delle cellule H929 ed è continuato ogni 2 o 3 giorni (q2d o q3d) a dosi di 10 ug, 1 ug e 0,1 ug/animale per un totale di cinque

trattamenti. Sono stati usati dieci topi in ciascun gruppo e il PBS è stato incluso come veicolo controllo. Il trattamento è stato arrestato il giorno 11 e lo studio è stato terminato il giorno 26 (Fig. 12 A-D). Tutte le molecole bispecifiche GPRC5D x CD3 sottoposte a prova in questo modello profilattico hanno mostrato un'inibizione della crescita del tumore del 100% alla dose di 10 e 1 ug/animale. La differenziazione è stata osservata alla dose più bassa, 0,1 ug/animale, con GCDB72 che ha dimostrato superiorità sugli altri anticorpi bispecifici sottoposti a prova, con un'inibizione della crescita del tumore osservata dell'80%.

Esempio 9: profilo di legame dell'anticorpo GPRC5D su linea di cellule MM1.R GPRC5D⁺

Le affinità di legame degli anticorpi GPRC5D su linea di cellule MM GPRCSD⁺ umana (MM1.R, acquistata da ATCC (American Type Culture Collection)) sono state misurate usando FACS. La Fig. 13 mostra che tutti gli anticorpi lead si legano alle cellule MM.1R che esprimono GPRC5D in modo dose-dipendente con valori EC₅₀ che variano da 0,10 nM a 135 nM, tutti ad eccezione di GC5B602, sono significativamente inferiori ai valori dell'anticorpo commerciale FAB6300 (R& D Systems Cat n. FAB6300A, Clone n. 571961) che ha prodotto un valore EC₅₀ di 121,7 nM.

Le linee di cellule MM1.R GPRCSD⁺ sono state colorate per 60 minuti con varie concentrazioni di anticorpi lead per misurare i profili di legame superficiale (n=3). Per catturare il segnale è stato usato Fc di IgG4 umana tracciato con ficoeritrina come anticorpo secondario (Southern Biotech, clone HP6025, cat. n. 9200-09). Il legame è espresso come intensità di fluorescenza media geometrica normalizzata, come determinato mediante FACS. La rappresentazione grafica e l'adattamento dei dati sono stati eseguiti in GraphPad Prism 6 usando la

regressione non lineare con pendenza variabile (quattro parametri) e il metodo di adattamento ai minimi quadrati.

Inoltre, il profilo di legame del mAb GPRC5D GC5M481 è stato esaminato in confronto all'anticorpo commerciale usando tre linee di cellule di mieloma multiplo GPRCSD⁺ (linee di cellule JIM3, OPM-2 e MM.1R; acquistate da ATCC) (Fig. 14A). Inoltre, l'mAb GPRC5D (GC5M481) è stato sottoposto a profilazione per la reattività crociata usando cellule Daudi che esprimono cyno-GPRCSD che hanno mostrato un forte legame in confronto alle cellule parentali (Fig. 14A). Anche, cinque anticorpi bispecifici GPRC5D x CD3 (GCDB32, GCDB48, GCDB53, GCDB61 e GCDB72) quando valutati per il potenziale di legame usando linee di cellule GPRC5D⁺ (JIM3, OPM-2 e MM1.R) (Fig. 14B) hanno mostrato un legame significativo come evidente dallo spostamento nell'istogramma (traccia nera continua) in confronto al controllo isotipico (traccia punteggiata e riempita in grigio).

Esempio 10: efficacia antitumorale di GCDB72 contro gli xenotrapianti di mieloma multiplo umano sottocutaneo MM.1S in topi NSG umanizzati con PBMC

Questo studio *in vivo* è stato svolto per determinare l'efficacia di GCDB72 contro xenotrapianti di mieloma multiplo (MM) MM.1S umano consolidati in topi NSG umanizzati con PBMC. Topi NSG femmine di peso ed età simili sono stati sottoposti a impianto per via sottocutanea (sc) di cellule MM umane MM.1S (1×10^7 cellule in 200 μ l di PBS per topo) sul fianco posteriore dorsale destro il giorno 0 dello studio. Il giorno 7 post impianto delle cellule di tumore, 1×10^7 PBMC umane (in 200 μ l di PBS) sono state iniettate per via endovenosa tramite la vena caudale laterale. I trattamenti sono stati iniziati il giorno 15, quando il volume medio del tumore era di circa 72-78 mm³, ogni topo ha ricevuto la somministrazione endovenosa (iv) di PBS o

anticorpo GCDB72 DuoBody a 0,1 µg (0,005 mg/kg), 1 µg (0,05 mg/kg), 10 µg (0,5 mg/kg) e 50 µg (2,5 mg/kg). I controlli Null DuoBody, CD3 x Null e Null x GPRC5D, sono stati dosati ciascuno a 10 µg per topo. I trattamenti sono stati somministrati circa ogni tre giorni (q3d) per un totale di sette dosi. È stata osservata una robusta efficacia anti-tumore con le due dosi elevate (10 µg e 50 µg) di GCDB72 in cui i tumori sc MM.1S sono regrediti completamente nel 100% (10 su 10 per gruppo) degli animali entro la fine dello studio (Fig. 16). Oltretutto, la dose di 1 µg per topo ha inibito significativamente la crescita del tumore del 65% ($p \leq 0,0001$) in confronto ai tumori trattati con PBS, mentre la dose di 0,1 µg ha avuto scarso effetto (TGI=19,3%, $p=0,0023$). L'effetto di CD3 x Null non è stato considerato efficace (TGI=28%, $p \leq 0,0001$) e Null x GPRC5D hanno avuto un effetto trascurabile del 3,1% TGI, $p=0,9971$. Il TGI è stato determinato il giorno 36, quando vi era almeno l'80% di animali vitali per gruppo. Dopo il giorno 36 si è manifestata una significativa perdita di peso corporeo e/o mortalità a causa della GVHD (Fig. 17). Lo studio è stato terminato il giorno 43, quando nei gruppi vi era il 60% o meno di animali rimanenti.

Esempio 11: citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) degli anticorpi GPRC5D

Un pannello di mAb anti-GPRC5D umano è stato generato come mAb IgG1. In aggiunta, è stato generato un nuovo pannello di mAb anti-GPRC5D umano come descritto nell'Esempio 2. Di seguito, nelle tabelle 28 e 29, sono raffigurate le sequenze della CDR e della regione variabile della catena pesante e leggera dei nuovi mAb GPRC5D. Questi nuovi anticorpi sono stati usati per la generazione di molecole CD3 bispecifiche come descritto nell'esempio 7 e sono stati anche incorporati come mAb IgG1 per valutazione dell'attività ADCC.

Tabella 28. Sequenze CDR del nuovo pannello di anticorpi GPRC5D

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B382	DYGMH (ID di SEQ n. 61)	AIKYSGGSTYYADSVKG (ID di SEQ n. 67)	RAESGPGLDY (ID di SEQ n. 72)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (ID di SEQ n. 98)	WASTRES (ID di SEQ n. 78)	QQYYSTPLT (ID di SEQ n. 80)
GC5B379	NYWMS (ID di SEQ n. 2)	GISYSGGSKYYADSVKG (ID di SEQ n. 28)	AAWDFGRRVRLDY (ID di SEQ n. 30)	RASQSISSYLN (ID di SEQ n. 13)	AASSLQS (ID di SEQ n. 16)	QQSYSTPLT (ID di SEQ n. 19)
GC5B373	SYWIG (ID di SEQ n. 27)	IIPGDS TRYSPSFQG (ID di SEQ n. 29)	IGFYGRSFRIDY (ID di SEQ n. 73)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B376	SYWIG (ID di SEQ n. 27)	IIPGDS TRYSPSFQG (ID di SEQ n. 29)	VYSFGGRHKALFDY (ID di SEQ n. 11)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B385	GYAMS (ID di SEQ n. 62)	AISGSGGSTYYADSVKG (ID di SEQ n. 68)	VDRSFGRSRYTLDY (ID di SEQ n. 74)	RASQSVSSYLA (ID di SEQ n. 14)	DASNRAT (ID di SEQ n. 17)	QQRSNWPLT (ID di SEQ n. 20)
GC5B370 GC5B597	SYGIS (ID di SEQ n. 63)	GIPIFGNINYAQKFQG (ID di SEQ n. 69)	VSRRFKRFAYYFDY (ID di SEQ n. 75)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (ID di SEQ n. 98)	WASTRES (ID di SEQ n. 78)	QQYYSTPLT (ID di SEQ n. 80)
GC5B602	GYSFTGYTMN (ID di SEQ n. 64)	LINPYNGDTN (ID di SEQ n. 70)	VALRVALDY (ID di SEQ n. 12)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)
GC5B603	SYAMS (ID di SEQ n. 65)	AISGSGGSTYYADSVKG (ID di SEQ n. 68)	SNFLPVVFDY (ID di SEQ n. 76)	RASQSVRKSLA (ID di SEQ n. 95)	TASNRAT (ID di SEQ n. 79)	QQYFRAPIT (ID di SEQ n. 81)
GC5B601	GFSLSYNVH (ID di SEQ n. 66)	VIWAGGSTNYNSALMS (ID di SEQ n. 71)	DGIRLRFAY (ID di SEQ n. 77)	KASQNVATHVG (ID di SEQ n. 15)	SASYRYS (ID di SEQ n. 18)	QQYNRYPYT (ID di SEQ n. 21)

Tabella 29. Sequenze della regione variabile della catena pesante e leggera del nuovo pannello di anticorpi GPRC5D

ID AA di mAb	Sequenza di amminoacidi di VH	ID di SEQ n.	Sequenza di amminoacidi di VL	ID di SEQ n.
GC5B382	EVQLLES GGGGLVQP GGS L RLSCAAS GFTFS DYGMH WVRQAPG KGLEWVSAIK YSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRAESGPGL DYWGQGTLVTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQP P KLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIK	92

ID AA di mAb	Sequenza di amminoacidi di VH	ID di SEQ n.	Sequenza di amminoacidi di VL	ID di SEQ n.
GC5B379	EVQLLES GGGLVQP GGS L RLSCAASGFTFSNYWMS WVRQAPGKGLEWVSGIS YSGGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKAAWDFGR RAVRLDYWGQGTLVTVS S	83	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFAVYYCQQRYS TPLTFGQGGTKVEIK	56
GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGHIYP GDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARIGFYGRSFRIF DYWGQGTLVTVSS	84	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLA WYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGGTKVEIK	57
GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGHIYP GDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARVYSFGGRHK ALFDYWGQGTLVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLA WYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGGTKVEIK	57
GC5B385	EVQLLES GGGLVQP GGS L RLSCAASGFTFSGYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVDRSFGRS RYTLDYWGQGTLVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLA WYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGGTKVEIK	57
GC5B370		87		92

ID AA di mAb	Sequenza di amminoacidi di VH	ID di SEQ n.	Sequenza di amminoacidi di VL	ID di SEQ n.
GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYGISW VRQAPGQGLEWMGGIPI FGNINYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVSRFRKFAY YFDYWGQGTLVTVSS		DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIK	
GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYSTGYTM NWVRQAPGQGLEWMGLI NPYNGDTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARVALRV ALDYWGQGTLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVATHVGW YQQKPGKAPKRLIYSASY RYSQVPSRFSGSGSGTEFT LTISNLQPEDFATYYCQQ YNRYPTYTFGQGTKLEIK	58
GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKSNFLPVVFD YWGQGTLVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVRKSLAWYQ QKPGQAPRLLIYTASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISLEPEDFAVYYCQQYFR APITFGQGTKVEIKK	93
GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETL TLTCTVSGFSLTSYNVHW IRQPPGKALEWLAVIWAG GSTNYNSALMSRLTISKD TSKSQVVLMTNMRAED TATYYCARDGIRLRFAYW GQGTLVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCKASQNVATHVGWY QQKPGQAPRLLIYSASYR YSGIPARFSGSGSGTEFTL TISLQSEDFAVYYCQQY NRYPPTYTFGQGTKLEIK	94

Attività ADCC contro le cellule H929 (Tabelle 30 e 31). In breve, le cellule del mieloma multiplo sono state tracciate con Calcein-AM per 30 minuti a temperatura ambiente e risospese a $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI + 10% HI FBS dopo due

lavaggi con PBS. Le PBMC sono state scongelate e risospese dopo il lavaggio con PBS a 3×10^6 cellule per ml nel mezzo di coltura RPMI. 10000 o 50000 cellule bersaglio sono state miscelate con 100000 o 2500000 PBMC in presenza dell'anticorpo e incubate per 3 ore in un incubatore a CO₂ a 37 °C. Dopo l'incubazione, la piastra è stata centrifugata a 200 g per 4 minuti e 100 µl di surnatante sono stati trasferiti in una nuova piastra a 96 pozzetti e l'intensità della fluorescenza è stata misurata a 485/535 nM. I valori RFU sono stati tracciati per calcolare la percentuale di lisi

Tabella 30: citotossicità anticorpo dipendente delle cellule H929 mediante mAb anti-GPRC5D con Fc di IgG1

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

Tabella 31: confronto tra la citotossicità anticorpo dipendente e la citotossicità delle cellule H929 mediata dalle cellule T

		ADCC	Reindirizzamento CD3
ID della proteina IgG1 GPRC5D	ID DuoBody GPRC5D x CD3	H929 Citotossicità EC50 (pM)	Citotossicità di H929 mediata dalle cellule T EC50 (nM)
GC5B382	GCDB40	1346,5	1,2 ± 0,83
GC5B379	GCDB43	87,4	0,39 ± 0,07
GC5B373	GCDB45	244,2	2,36 ± 0,84
GC5B376	GCDB35	22,0	1,39 ± 0,75
GC5B385	GCDB44	944,0	>10
GC5B370	GCDB41	24,2	>10
GC5B602	GCDB72	27721,7	0,15
GC5B603	GCDB48	3,4	0,17
GC5B599	GCDB61	7,4	1,51
GC5B601	GCDB69	169,6	0,58
GC5B598	GCDB53	2,0	0,24

È stato osservato un intervallo di potenza che varia da 2 pM a 27,7 nM. L'affinità di legame non era necessariamente predittiva dell'efficacia nel saggio ADCC. Per esempio, GC5B382 e GC5B379 avevano un'affinità di legame simile alle cellule GPRC5D umane, ma una differenza di 15x nella citotossicità contro le cellule H929 nel saggio ADCC. Similmente, l'induzione citotossica come GPRC5D x CD3 bispecifico non era predittiva della potenza nel saggio ADCC come esemplificato da GC5B370 e GC5B602. Quando formattato come GC5B602

bispecifico CD3 (GCDB63) aveva una potenza sub-nanomolare contro le cellule H929, mentre GC5B370 come bispecifico CD3 (GCDB41) era essenzialmente inattivo. Le stesse regioni v, quando formattate come mAb IgG1, hanno dato come risultato l'osservazione opposta nel saggio ADCC, con GC5B370 osservato come più potente (di ~1100 volte) su GC5B602.

Breve descrizione dell'elenco delle sequenze

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
1	PRT	umano	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431 e GC5B429-HCDR1	SYAIS
2	PRT	umano	GC5B379, GC5B598, GC5B465, GC5B285, GC5B463, GC5B432, GC5B433, GC5B434,	NYWMS
			GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462, GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, GC5B442, GC5B443, GC5B444,	

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
			GC5B464, GC5B445, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449 e GC5B450 - HCDR1	
3	PRT	umano	GC5B483, GC5B473, GC5B478, GC5B488, GC5B493 e GC5B498 - HCDR1	SYFIG
4	PRT	umano	GC5B596-HCDR1	GYTMN
5	PRT	umano	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431 e GC5B429-HCDR2	GIPIFGTANYAQKFQG
6	PRT	umano	GC5B598, GC5B465, GC5B432 e GC5B447-HCDR2	GISYSGGSKYYASSVKG
7	PRT	umano	GC5B599, GC5B483, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485 e GC5B503-HCDR2	IIYPGKSDTRYSPSFQG
8	PRT	umano	GC5B596-HCDR2	LINPYNSDTNYAQLQG

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
9	PRT	umano	GCB581-HCDR3	ESRWRGYKLD
10	PRT	umano	GC5B598, GCB5465-HCDR3	AAFDGRRRAVRLD
11	PRT	umano	GC5B376, GC5B599, GC5B483, GC5B164, GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485, GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499, GC5B500, GC5B501,	VYSFGGRHKALFDY

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
			GC5B502, GC5B503, GC5B504 e GC5B505 - HCDR3	
12	PRT	umano	GC5B602, GCB596-HCDR3	VALRVALDY
13	PRT	umano	GC5B382, GC5B379, GC5B370, GC5B598, GC5B597, GC5B81, GC5B465-LCDR1	RASQSISSYLN
14	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR1	RASQSVSSYLA
15	PRT	umano	GC5B605, GC5B601, GC5B596-LCDR1	KASQNVATHVG
16	PRT	umano	GC5B81, GC5B465, GC5B379, GC5B598-LCDR2	AASSLQS
17	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR2	DASNRAT
18	PRT	umano	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR2	SASYRYS

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
19	PRT	umano	GC5B379, GC5B598, GC5B81, GC5B465-LCDR3	QQSYSTPLT
20	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR3	QQRSNWPLT
21	PRT	umano	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	umano	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILES LAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQW NVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVL FALCFSCLLAHASNLVKLVRGCVSFSW TTILCIAIGCSLLQ IIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNV DFVVLLVYVFLMALTFVSKATFCGP CENWKQHGRLLFITV LFSIIIWVWISMLLRGNPQFQRQPQWD DPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILY RSCRQECPLQGNAC PVTAYQHSHFQVENQELSRARDSDGAE DVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAK LSPQQDAGGV

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
23	PRT	cyno	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLES LAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQW NVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIQLNQQTAPVRYFLFGV LFALCFSCLLAHASNLVKLVRGRVSFS WTTILCIAIGCSLLQVIIAIEYVTIMTRG MMFVHMTPYQLNVDFVLLVYVFLM ALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRILFIT VLFSIIIWVWISMLLRGNPQFQRQPQW DDPVVCIALVTNA WVFLLYIVPELCILYRSCRQECPSQGH ACPVTA YQRSFQVENQELSRARDSGA EEDVALTSFGTPIQPQTVDPQTQECFIPRA KLSPQQDAGV
24	PRT	topo	GPRC5D	MYEDCVKSTEDYYLFCDNEGPWAIVLE SLAVIGIVVTILLLLAFLFLMRKVQDCS QWNVLPTQFLFLLAV LGLFGLTFAFIIQLNHQTAPVRYFLFGVL FAICFSCLLAHASNLVKLVRGRVSFCWT TILFIAIGVSLLQ TIIAIEYVTIMTRGLMFEHMTPTYQLNV DFVCLLIYVFLMAL TFFVSKATFCGPC ENWKQHGRILFATV LVSIIWVWISMLLRGNPQLQRQPHW DDAVICIGLVTNWVFLLIYIPELSILYR SCRQECPTQGNVC QVPVYQRSFRMDTQEPTRARDSGAQE DVALTAYGTPIQLQSADPSREYLIPSATL SPQQDAGL
25	PRT	umano	CD3B219- CATENA PESANTE	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNTATYYAASVKGRFTISRDDSKNS LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGN SYVSWFAYWGQGLTVTVSS

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
26	PRT	umano	CD3B219-CATENA LEGGERA	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLT VL
27	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504 e GC5B505 - HCDR1	SY <u>W</u> IG
28	PRT	umano	GC5B379, GC5B285, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464 e GC5B445-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG
29	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499 e GC5B500-HCDR2	IIYPG <u>D</u> SDTRYSPSFQG
30	PRT	umano	GC5B379, GC5B285, GC5B446, GC5B447, GC5B448,	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
			GC5B449 e GC5B450-HCDR3	
31	PRT	umano	GC5B427-HCDR3	ESRYRGYKLDY
32	PRT	umano	GC5B428-HCDR3	ESR <u>V</u> RGYKLDY
33	PRT	umano	GC5B430-HCDR3	ESR <u>G</u> RGYKLDY
34	PRT	umano	GC5B431-HCDR3	ESR <u>A</u> RGYKLDY
35	PRT	umano	GC5B429 HCDR3-VH	ESR <u>F</u> RGYKLDY
36	PRT	umano	GC5B471, GC5B476, GC5B486, GC5B481, GC5B491 e GC5B496, - HCDR1	SY <u>Y</u> IG
37	PRT	umano	GC5B497, GC5B472, GC5B477, GC5B482, GC5B487 e GC5B492-HCDR1	SY <u>V</u> IG
38	PRT	umano	GC5B474, GC5B479, GC5B484, GC5B489, GC5B494 e GC5B499-HCDR1	SY <u>G</u> IG
39	PRT	umano	GC5B475, GC5B480, GC5B485, GC5B490, GC5B495 e GC5B500-HCDR1	SY <u>A</u> IG

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
40	PRT	umano	GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475 e GC5B501-HCDR2	IIYPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG
41	PRT	umano	GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480 e GC5B502 - HCDR2	IIYPG <u>S</u> SDTRYSPSFQG
42	PRT	umano	GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490 e GC5B504-HCDR2	IIYPG <u>E</u> SDTRYSPSFQG
43	PRT	umano	GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495 e GC5B505-HCDR2	IIYPG <u>Y</u> SDTRYSPSFQG
44	PRT	umano	GC5B463 e GC5B446-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG
45	PRT	umano	GC5B433, GC5B434 e GC5B448-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG
46	PRT	umano	GC5B435, GC5B436, GC5B461,	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
			GC5B462 e GC5B449-HCDR2	
47	PRT	umano	GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441 e GC5B450-HCDR2	GISYSGGSKYYAYS_VK_G
48	PRT	umano	GC5B463, GC5B435, GC5B437 e GC5B442-HCDR3	AA_YDFGRRAVRLDY
49	PRT	umano	GC5B432, GC5B433, GC5B438 e GC5B443-HCDR3	AA_YDFGRRAVRLDY
50	PRT	umano	GC5B461, GC5B440 e GC5B464-HCDR3	AAG_DFGRRAVRLDY
51	PRT	umano	GC5B462, GC5B441 e GC5B445-HCDR3	AA_ADFGRRAVRLDY
52	PRT	umano	GC5B81-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGG TFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSED TAVYYCARES RWRGYKLDY WGQGTLVTVSS
53	PRT	umano	GC5B598, GC5B465-VH	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFT FSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYS GGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLR AEDTAVYYCAKAAFD FGRR VRLDYWGQGTLVTVSS

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
54	PRT	umano	GC5B599, GC5B483-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGK SDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALF DYWGQGTLVTVSS
55	PRT	umano	GC5B596-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLIN PYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVAL DYWGQGTLVTVSS
56	PRT	umano	GC5B379, GC5B598, GC5B81 e GC5465-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
57	PRT	umano	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAV YYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK
58	PRT	umano	GC5B596, GC5B602-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYSR YSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDF ATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK
59	PRT	umano	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
				KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLK

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
60	PRT	umano	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	PRT	umano	GC5B382-HCDR1	DYGMH
62	PRT	umano	GC5B385-HCDR1	GYAMS
63	PRT	umano	GC5B370, GC5B597-HCDR1	SYGIS
64	PRT	umano	GC5B602-HCDR1	GYSFTGYTMN
65	PRT	umano	GC5B603-HCDR1	SYAMS
66	PRT	umano	GC5B601-HCDR1	GFSLTSYNVH
67	PRT	umano	GC5B382-HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
68	PRT	umano	GC5B603, GC5B385-HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
69	PRT	umano	GC5B370, GC5B597-HCDR2	GIPIFGNINYAQKFQG
70	PRT	umano	GC5B602-HCDR2	LINPYNGDTN
71	PRT	umano	GC5B601-HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
72	PRT	umano	GC5B382-HCDR3	RAESGPGLDY
73	PRT	umano	GC5B373-HCDR3	IGFYGRSFRIFDY
74	PRT	umano	GC5B385-HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
75	PRT	umano	GC5B370, GC5B597-HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
76	PRT	umano	GC5B603-HCDR3	SNFLPVVFDY
77	PRT	umano	GC5B601-HCDR3	DGIRLRFAY
78	PRT	umano	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR2	WASTRES
79	PRT	umano	GC5B603-LCDR2	TASNRAT
80	PRT	umano	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR3	QQYYSTPLT
81	PRT	umano	GC5B603-LCDR3	QQYFRAPIT
82	PRT	umano	GC5B382-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLD YWGQGTLLTVSS
83	PRT	umano	GC5B379-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYS GGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRR AVRLDYWGQGTLLTVSS
84	PRT	umano	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPG DSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFRIF DYWGQGTLLTVSS
85	PRT	umano	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPG DSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKA LFDYWGQGTLLTVSS

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
86	PRT	umano	GC5B385-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRSR YTLDYWGQGT LVTVSS
87	PRT	umano	GC5B370, GC5B597-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGG TFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF GNINYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSED TAVYYCARVSRFRKFAYY FDYWGQGT LVTVSS
88	PRT	umano	GC5B602-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASG YSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLIN PYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVAL DYWGQGT LVTVSS
89	PRT	umano	GC5B603-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVFDY WGQGT LVTVSS
90	DNA	umano	GC5B596-catena leggera	Atgctgggtgctggccagctgctgggactgctgctgctgc ttccctggcgccagatgcgacatccagatgaccagagcccc agcagcctgagcgccagcgtggggcgaccgggtgaccatca cctgcaaggccagccagaacgtggccacccacgtgggctg gtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagcggctgatct acagcgccagctaccggtacagcggtgctgcccagccgggtc agcggcagcggcagcggcaccgagttcacctgaccatca gcaacctgcagcccgaggacttgcacctaactgcccagc agtacaaaccggtacccctacacctcgggcagggcaccaag ctggagatcaagcgtacgggtggctgaccatctgtcttcattt cccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttg tgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaca gtggaagggtgataacgccctccaatcggttaactcccagga gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc ctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaa acacaaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgag ctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtggtga

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
91	PRT	umano	GC5B601-VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRFAYWGQGTLLTVSS
92	PRT	umano	GC5B382, GC5B597, GC5B370 - VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK
93	PRT	umano	GC5B603-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYCQQYFRAPITFGQGTKVEIKK
94	PRT	umano	GC5B601-VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYCQQYNRYPTYTFGQGTKLEIK
95	PRT	umano	GC5B603-LCDR1	RASQSVRKSLA

ID di SEQ n.	Tipo	Specie	Descrizione	Sequenza
96	DNA	umano	GC5B596-catena pesante	atggcctgggtctggaccctgctgttctgatggccgctgcc agagcatccaggccaggtgcagctgggtgcagagcggcgc cgaggtgaagaagcccgcgccagcgtgaagggtgagctgc aaggccagcggctacagcttcaccggctacacatgaactg gggtcggcaggcccccgccagggcctggagtggatggc ctgatcaaccctacaacagcgacaccaactacgccagaa gctgcagggccgggtgacatgaccaccgacaccagcacc agcaccgcctacatggagctgcggagcctgcggagcgacg acaccgccgtgtactactgcgccgggtggccctgcgggtg gccttgactactggggccagggcaccctggtgacctgag cagcgctccaccaaggggcccatccttccccctggcgcc ctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccccctgggt gcctggtaaggactactccccgaaccggtgacgggtgctg ggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccc gctgtctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtgg tgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacact gcaacgtagatcaaacccagcaacacaaagggtggacaa gagagttgagtccaaatatggcccccatgccaccatgccc agcacctgaggccgcccggggaccatcagtcttctgttccc cccaaaaccaaggacactctcatgatctccggaccctga ggtcacgtgcgtggtgggtgacgtgagccaggaagacccc aggtccagttcaactgtacgtggatggcgtgaggtgcata atgccaagacaaagccgcccggaggagcagttcaacagcac gtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactg gctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaag gcctccgctcctcatcgagaaaacctctccaagccaag ggcagccccgagagccacagggtgtacacctgccccatcc caggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcct gggtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcc tccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcagg
				ctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtctt ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaca cagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo isolato, o un frammento legante l'antigene di esso, che si lega specificamente al recettore accoppiato alla proteina G di classe C gruppo 5 membro D (GPRC5D), in cui l'anticorpo o il frammento legante l'antigene di esso comprende una regione della catena pesante variabile (VH) di ID di SEQ n. 55 e una regione della catena leggera variabile (VL) di ID di SEQ n. 58.
2. L'anticorpo o il frammento legante l'antigene della rivendicazione 1 in cui:
 - a. l'anticorpo o il frammento legante l'antigene è un anticorpo o un frammento legante l'antigene umano;
 - b. l'anticorpo o il frammento legante l'antigene è ricombinante;
 - c. il frammento legante l'antigene è un frammento Fab, un frammento Fab2, o un anticorpo a catena singola;
 - d. l'anticorpo o il frammento legante l'antigene di esso sono di isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; e/o
 - e. l'anticorpo o il frammento legante l'antigene è un isotipo IgG1 o IgG4, facoltativamente in cui:
 - i. l'IgG1 ha una sostituzione K409R nella sua regione Fc;
 - ii. l'IgG1 ha una sostituzione F405L nella sua regione Fc; o
 - iii. l'IgG4 ha una sostituzione F405L e una sostituzione R409K nella sua regione Fc.
3. Anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 isolato comprendente:

- a) una prima catena pesante (HC1);
- b) una seconda catena pesante (HC2);
- c) una prima catena leggera (LC1); e
- d) una seconda catena leggera (LC2),

in cui HC1 e LC1 si accoppiano per formare un primo sito legante l'antigene che lega specificamente CD3, e HC2 e LC2 si accoppiano per formare un secondo sito legante l'antigene che lega specificamente GPRC5D, o un frammento legante bispecifico GPRC5D x CD3 di esso, in cui HC1 comprende ID di SEQ n. 25 e LC1 comprende ID di SEQ n. 26, e in cui HC2 comprende ID di SEQ n. 55 e LC2 comprende ID di SEQ n. 58.

4. L'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o frammento legante bispecifico della rivendicazione 3 in cui:

a. l'anticorpo o il frammento legante bispecifico sono di isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; facoltativamente in cui l'anticorpo o il frammento legante bispecifico è l'isotipo IgG4;

b. l'anticorpo o il frammento legante bispecifico di esso lega GPRC5D sulla superficie delle cellule di mieloma umane; e/o

c. l'anticorpo o il frammento legante bispecifico di esso lega GPRC5D sulla superficie delle cellule di mieloma multiplo umane.

5. L'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 della rivendicazione 3 o 4, in cui HC1 comprende ID di SEQ n. 99 e LC1 comprende ID di SEQ n. 100.

6. Cellula isolata che esprime l'anticorpo o il frammento legante bispecifico o il frammento legante l'antigene di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5.
7. La cellula isolata della rivendicazione 6, in cui la cellula è un ibridoma o l'anticorpo o il frammento legante bispecifico o il frammento legante l'antigene è prodotto in modo ricombinante.
8. Anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o frammento legante bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5 per l'uso nel trattamento del cancro.
9. L'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico per l'uso secondo la rivendicazione 8 in cui il cancro è un cancro ematologico, facoltativamente in cui il cancro ematologico è un cancro a cellule B che esprime GPRC5D, come in cui il cancro a cellule B che esprime GPRC5D è il mieloma multiplo.
10. L'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico per l'uso secondo la rivendicazione 8 comprendente la somministrazione di un secondo agente terapeutico; facoltativamente in cui il secondo agente terapeutico è un agente chemioterapico o una terapia anti-cancro mirata, come in cui:
 - a. l'agente chemioterapico è citarabina, un'antraciclina, istamina dicloridrato, o interleuchina 2; e/o
 - b. il secondo agente terapeutico viene somministrato a detto soggetto simultaneamente, in sequenza, o separatamente dall'anticorpo bispecifico.
11. Composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5 e un veicolante farmaceuticamente accettabile.

12. Metodo per generare l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5 mediante coltura della cellula della rivendicazione 6 o 7.
13. Uno o più polinucleotidi sintetici isolati che codificano HC1, HC2, LC1 e LC2 dell'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o frammento legante bispecifico di una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5.
14. Kit comprendente l'anticorpo bispecifico GPRC5D x CD3 o il frammento legante bispecifico come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5 e/o l'uno o più polinucleotidi come definito nella rivendicazione 13 e impaccamento per lo stesso.
-

Figura 1

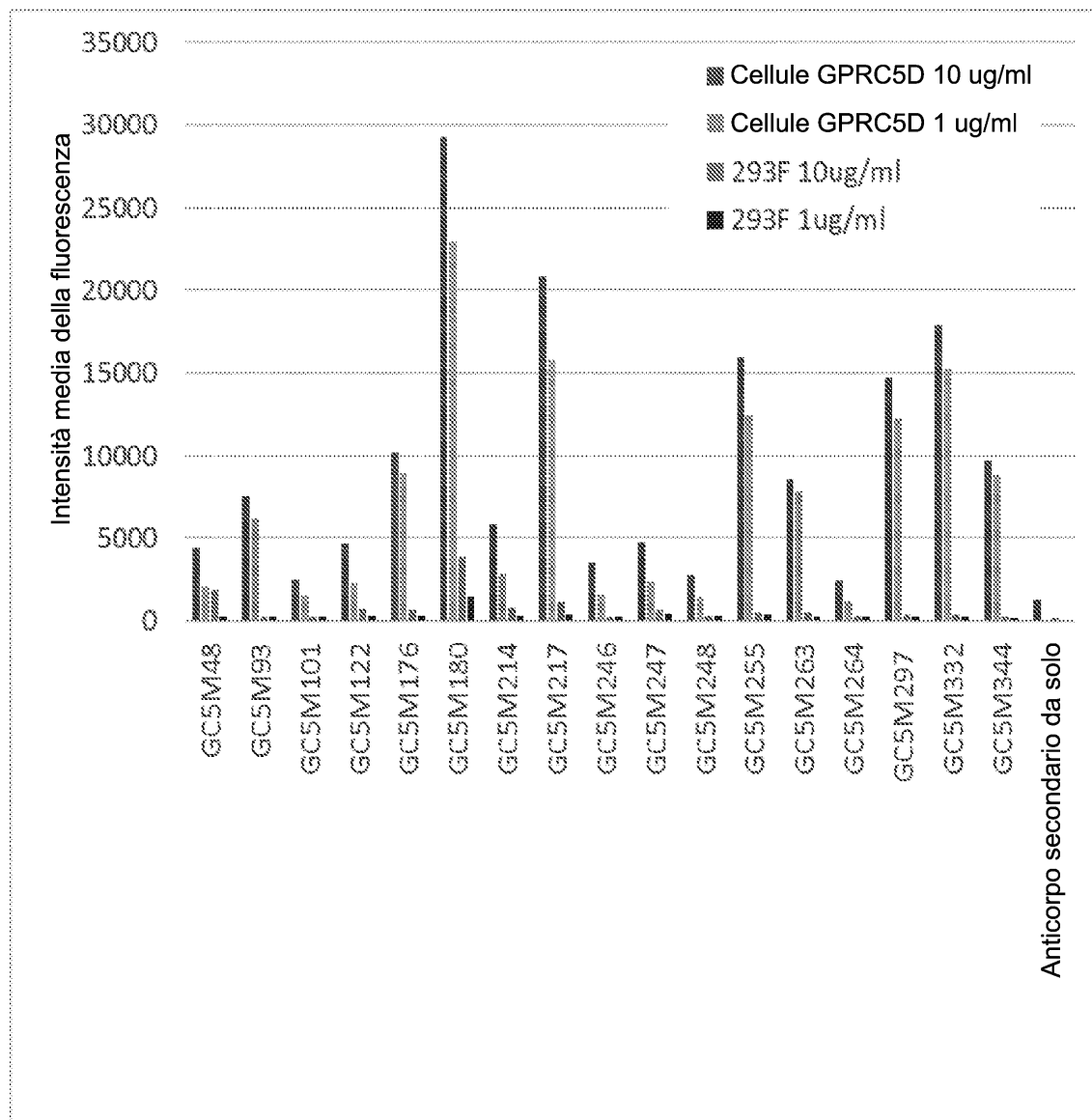


Figura 2

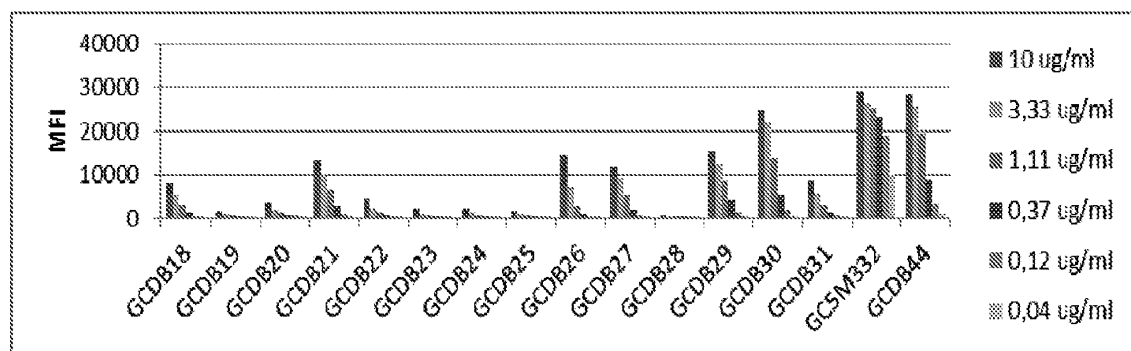


Figura 3

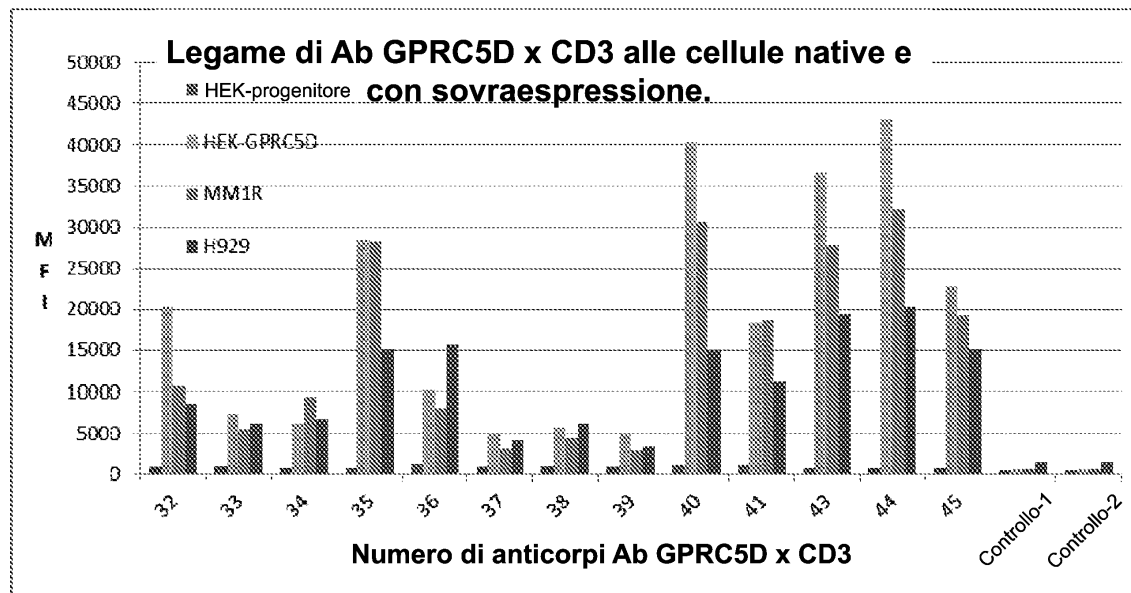


Figura 4A

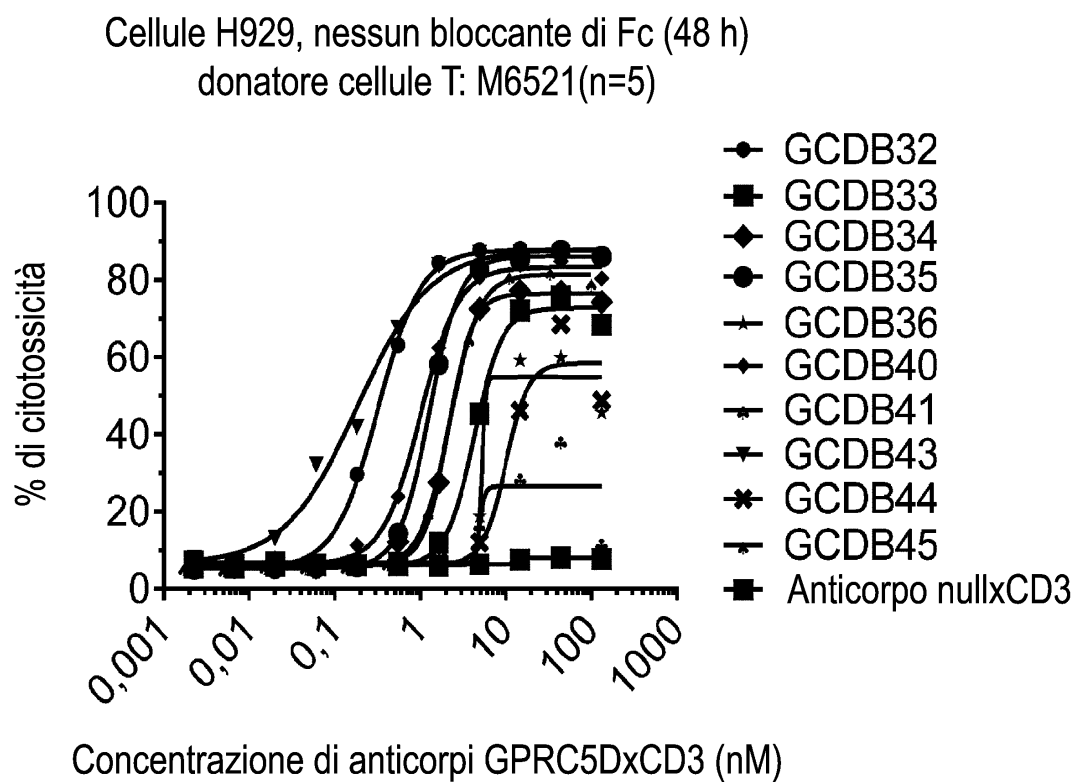


Figura 4B

Cellule H929, nessun bloccante di Fc (48 h)
donatore cellule T: M6521(n=3)

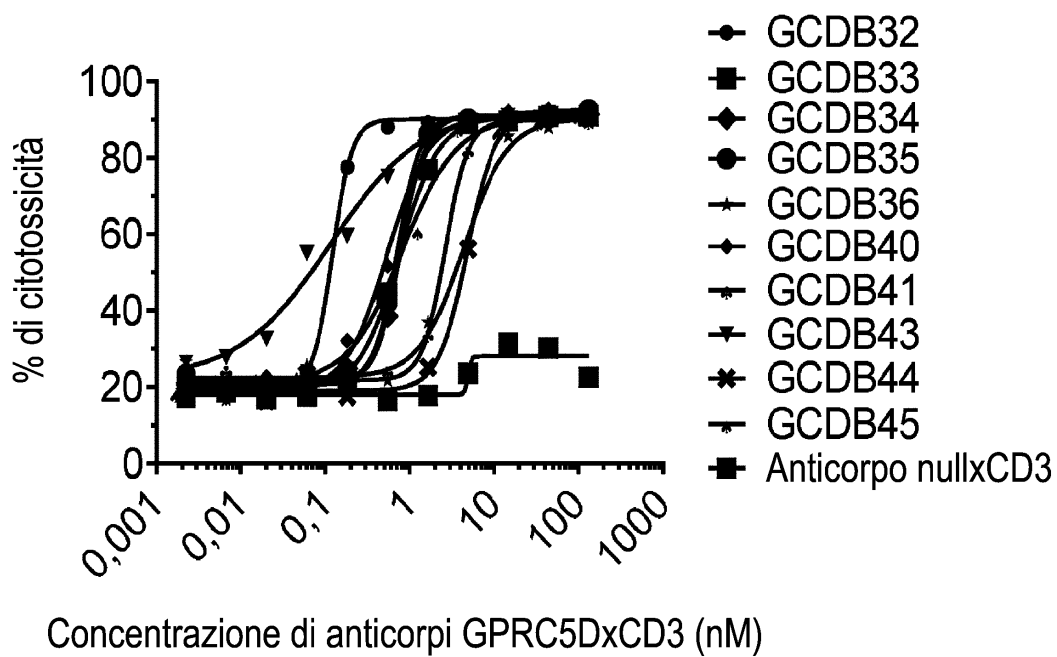


Figura 5A

Cellule 293F-GPRC5D(Cyno), nessun bloccante di Fc (48 h)
donatore cellule T: M6521(n=1)

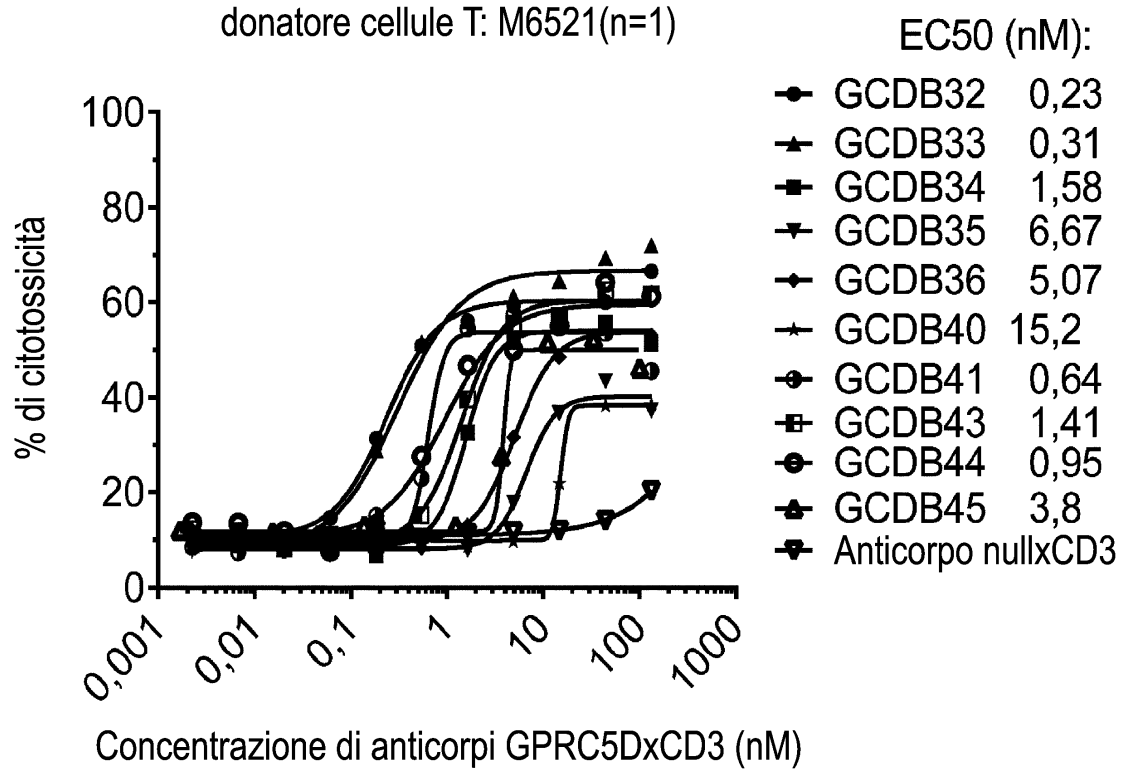


Figura 5B

Cellule 293F-GPRC5D(Cyno), nessun bloccante di Fc (48 h)
donatore cellule T: M6521(n=1)

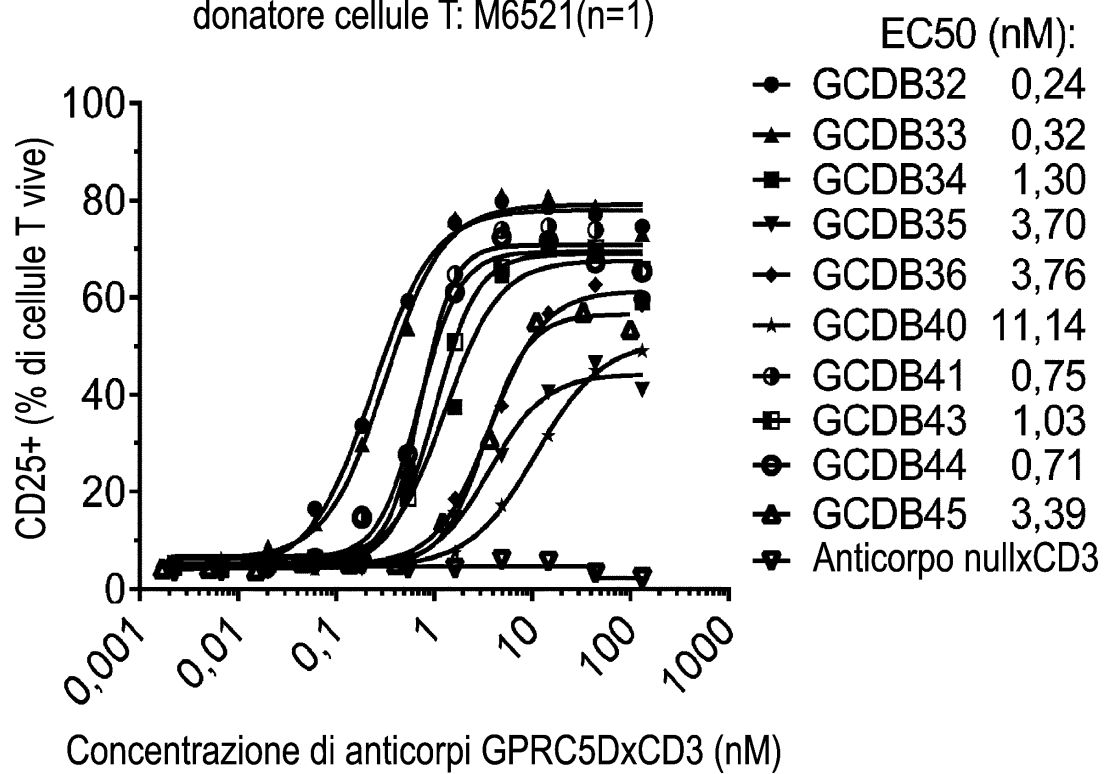


Figura 6A

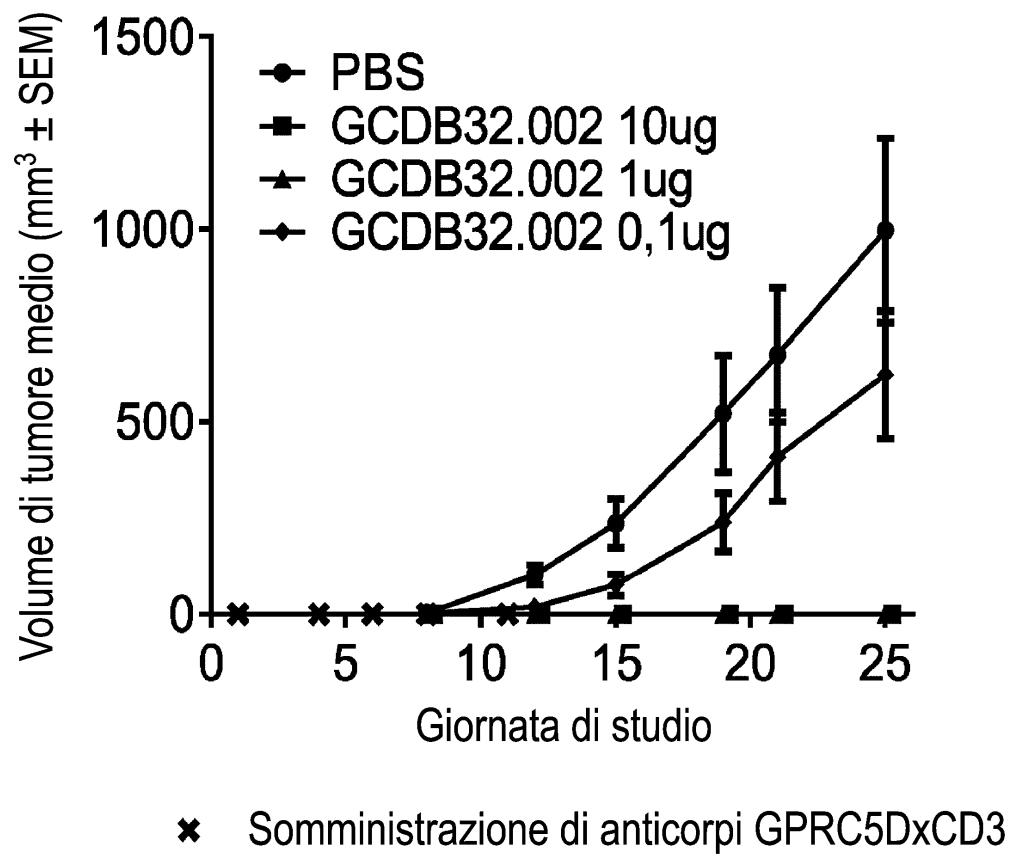


Figura 6B

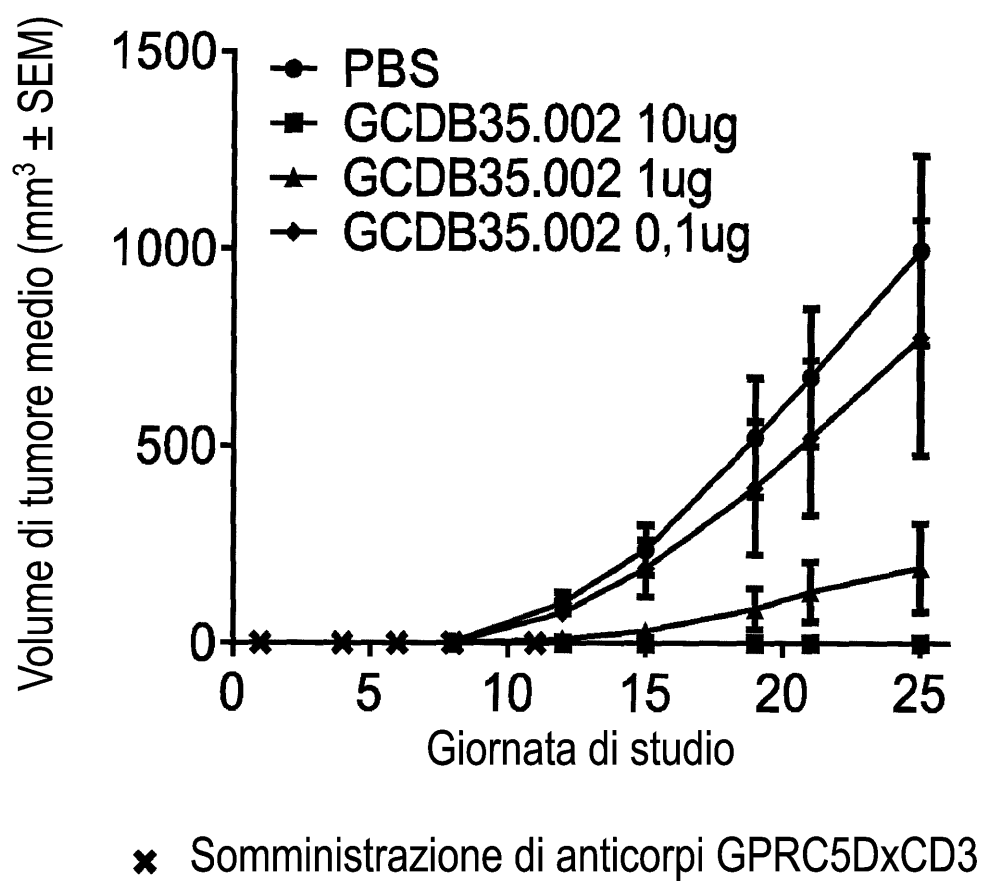


Figura 7A

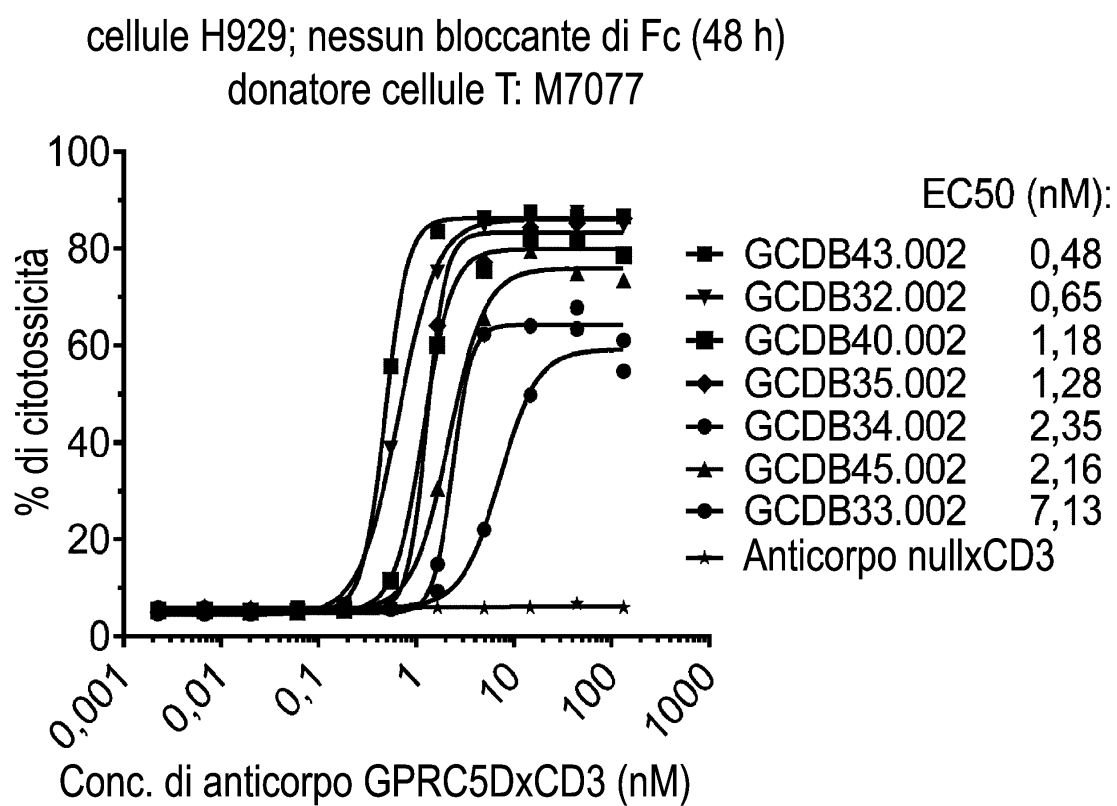


Figura 7B

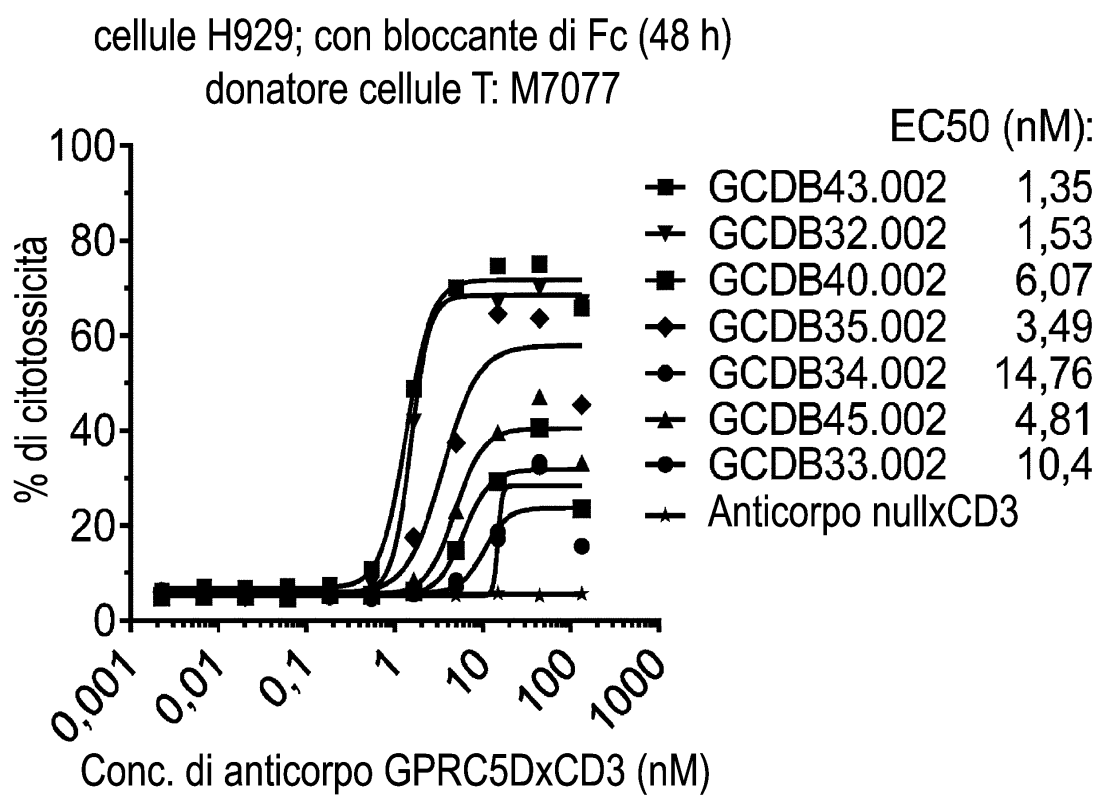
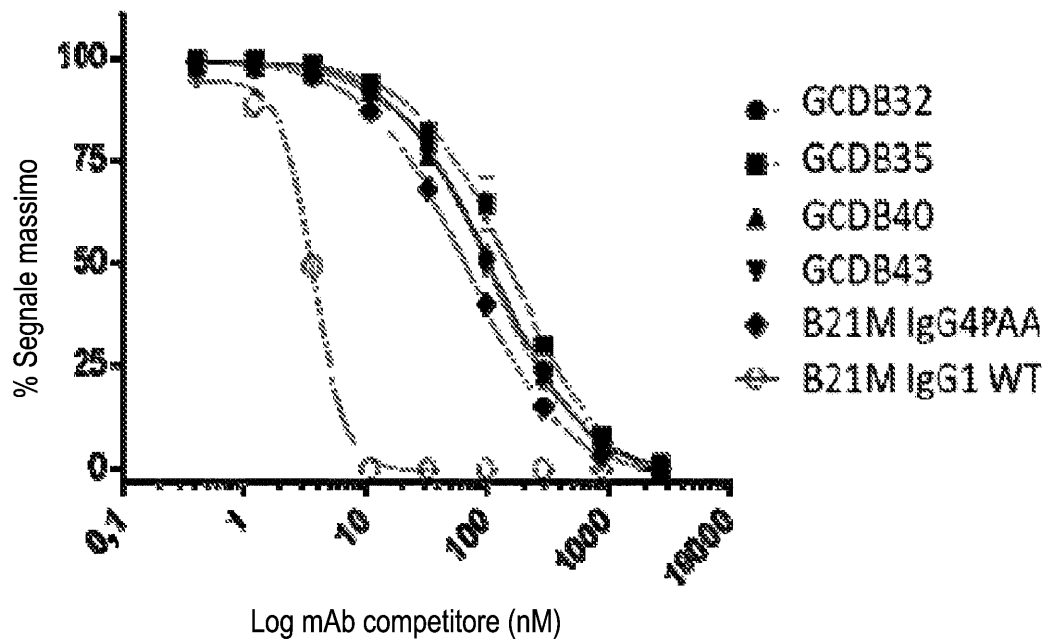


Figura 8A
FcγRI umano



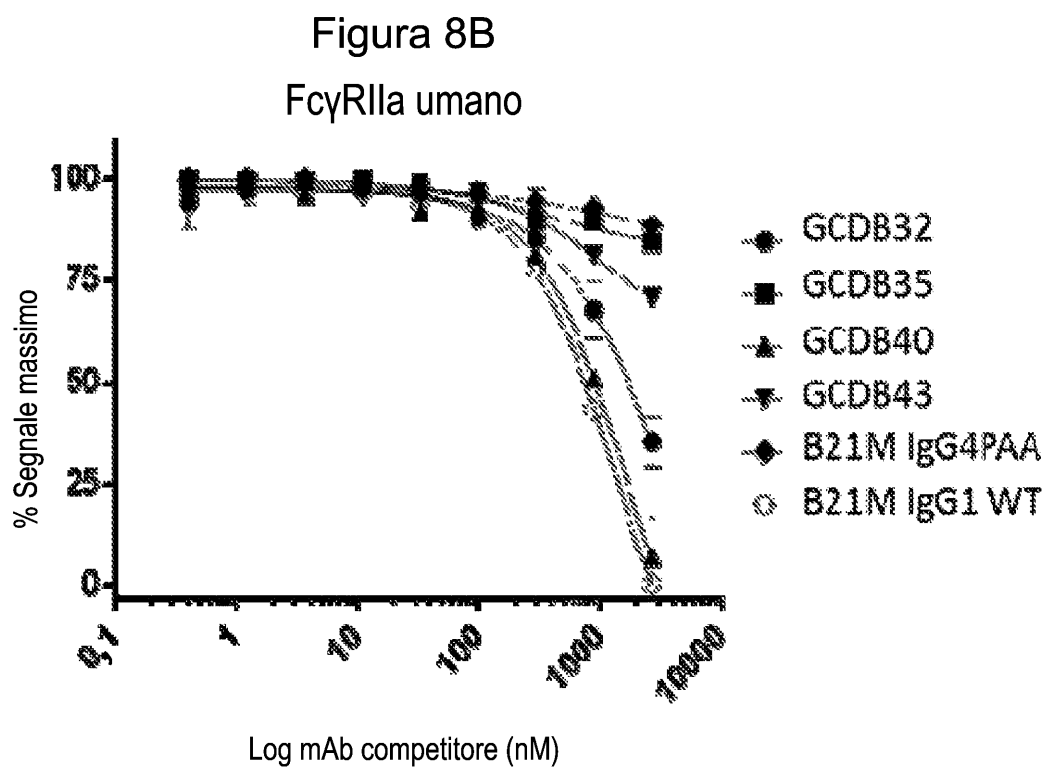


Figura 8C

FcγRIIb umano

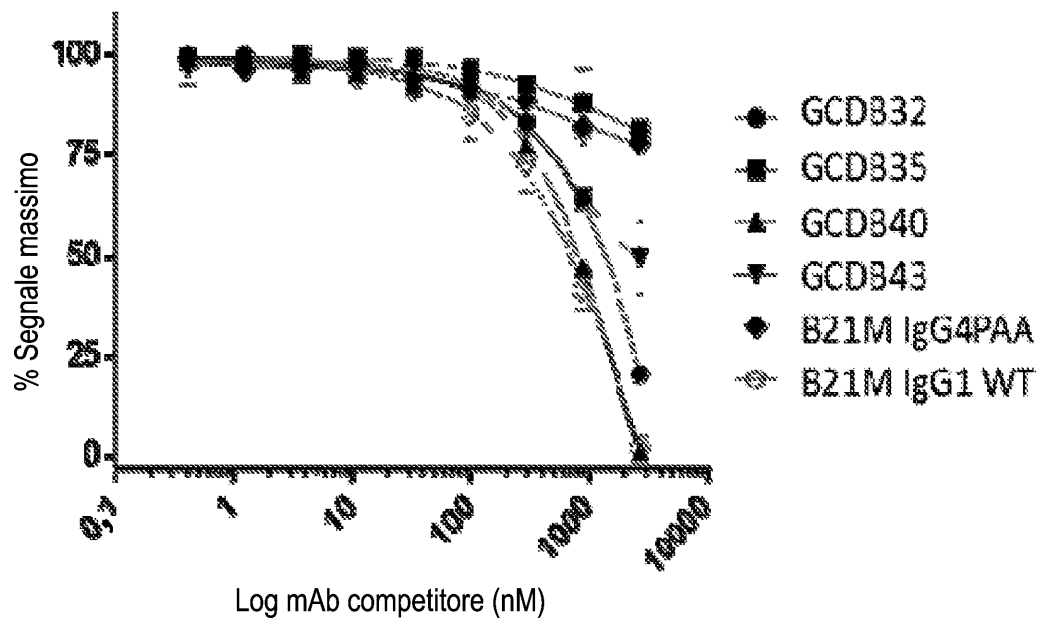


Figura 8D
FcγRIIIa umano

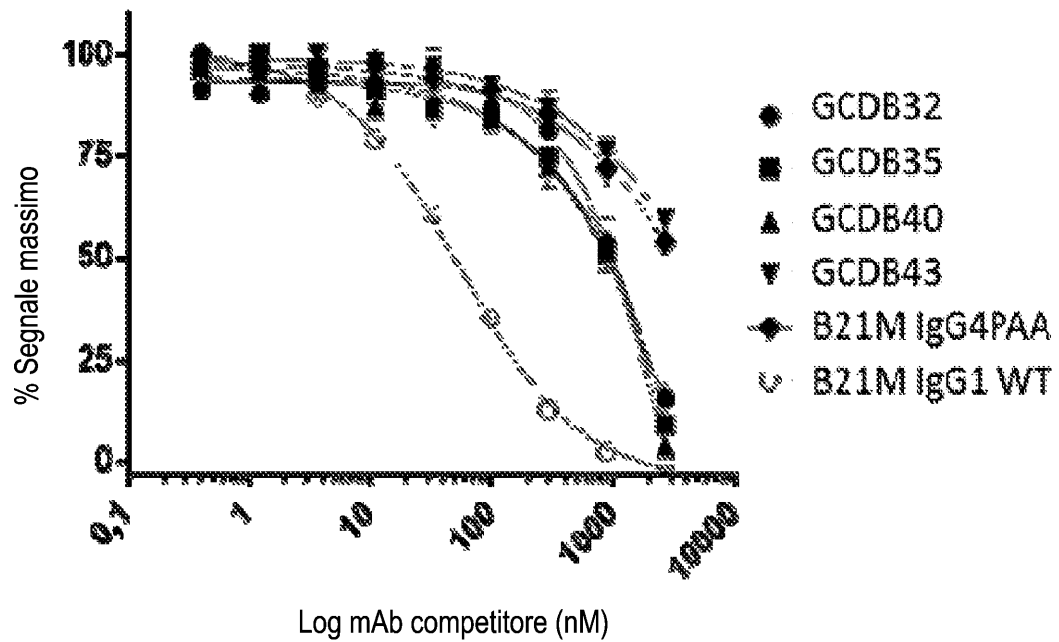


Figura 9A

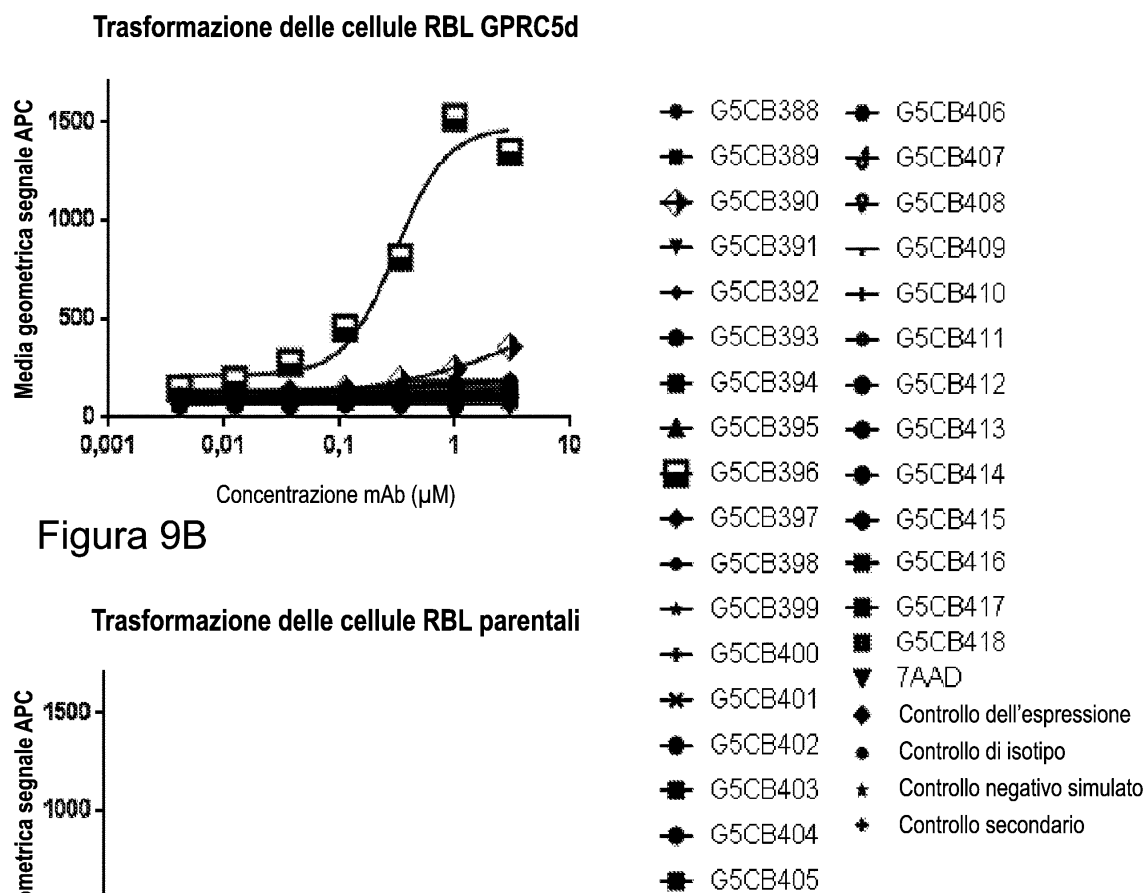


Figura 10A

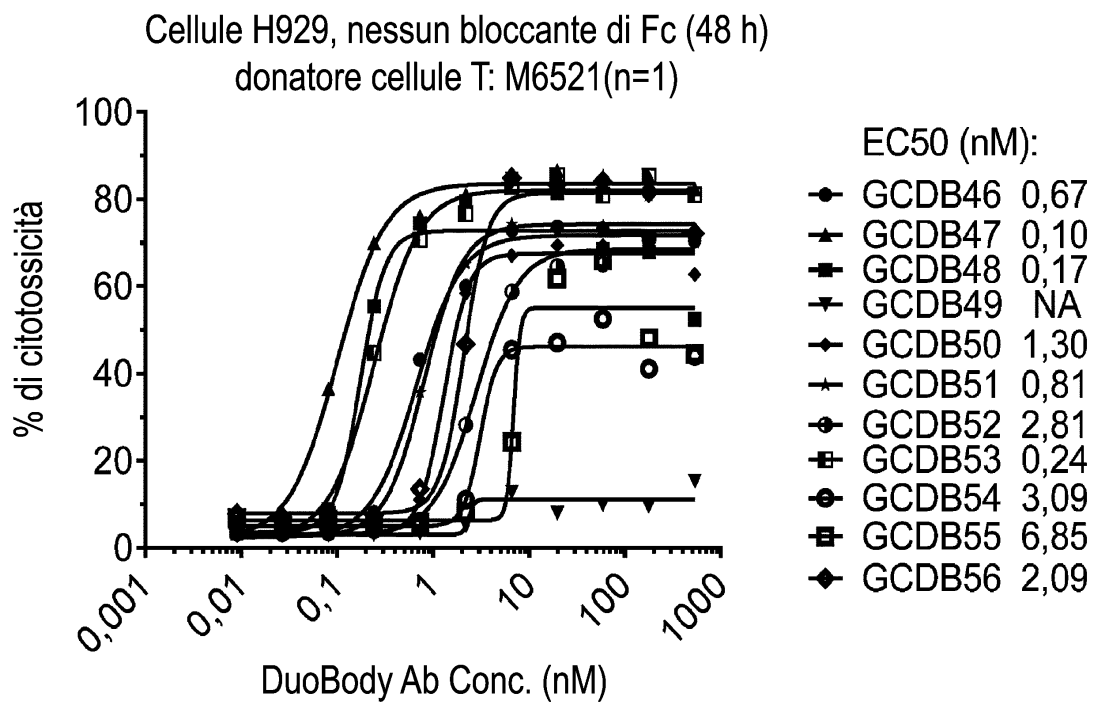


Figura 10B

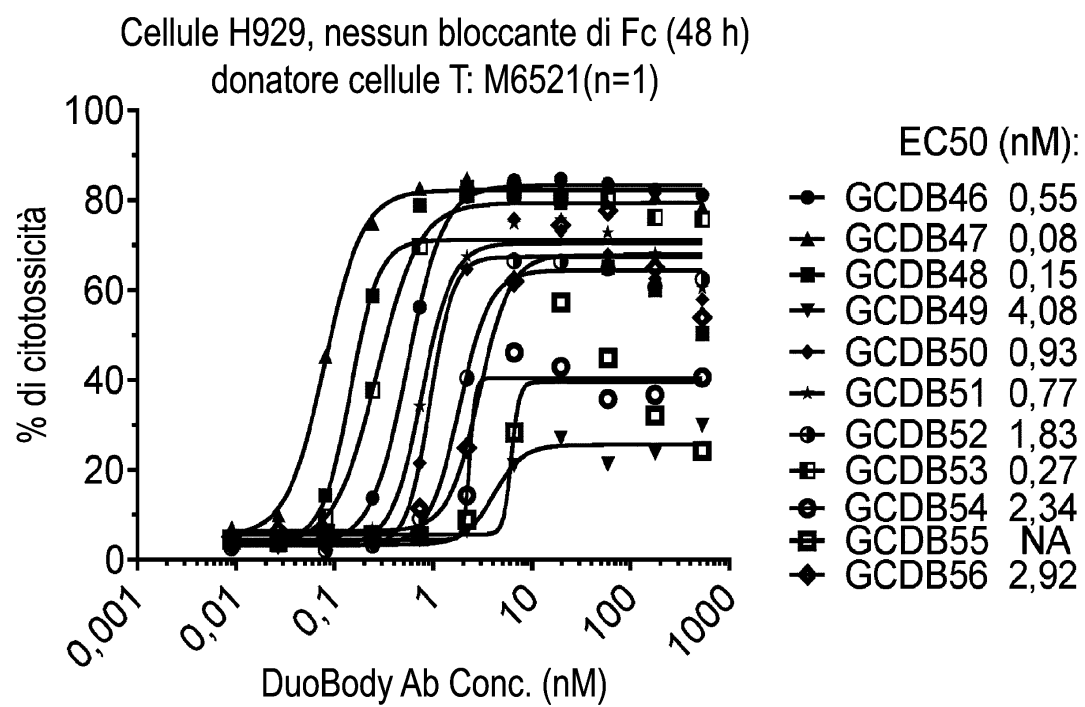


Figura 11A

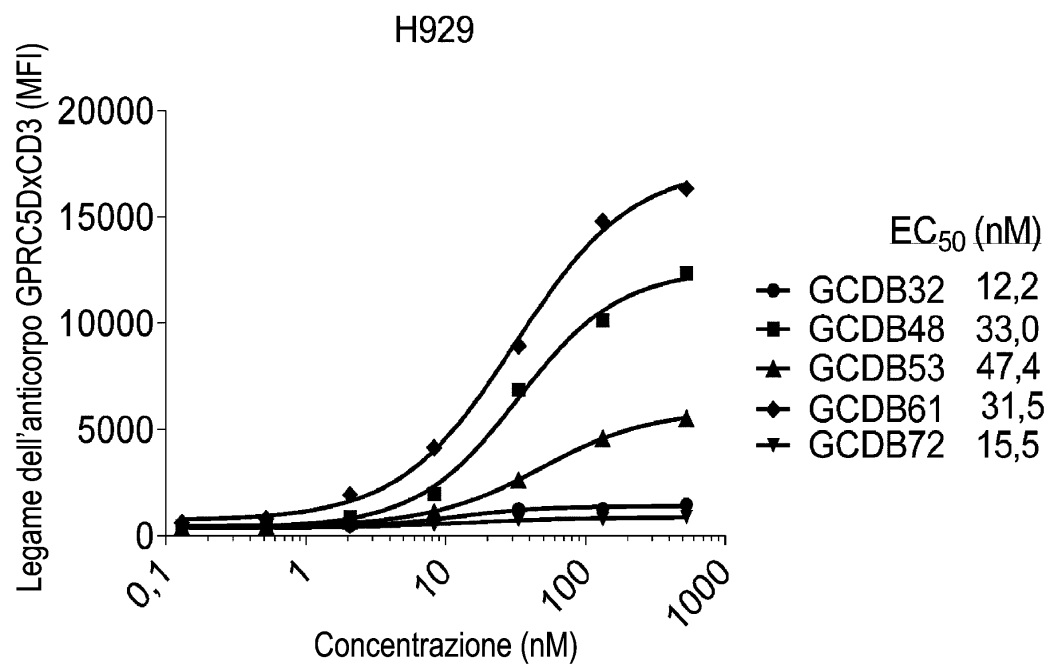


Figura 11B

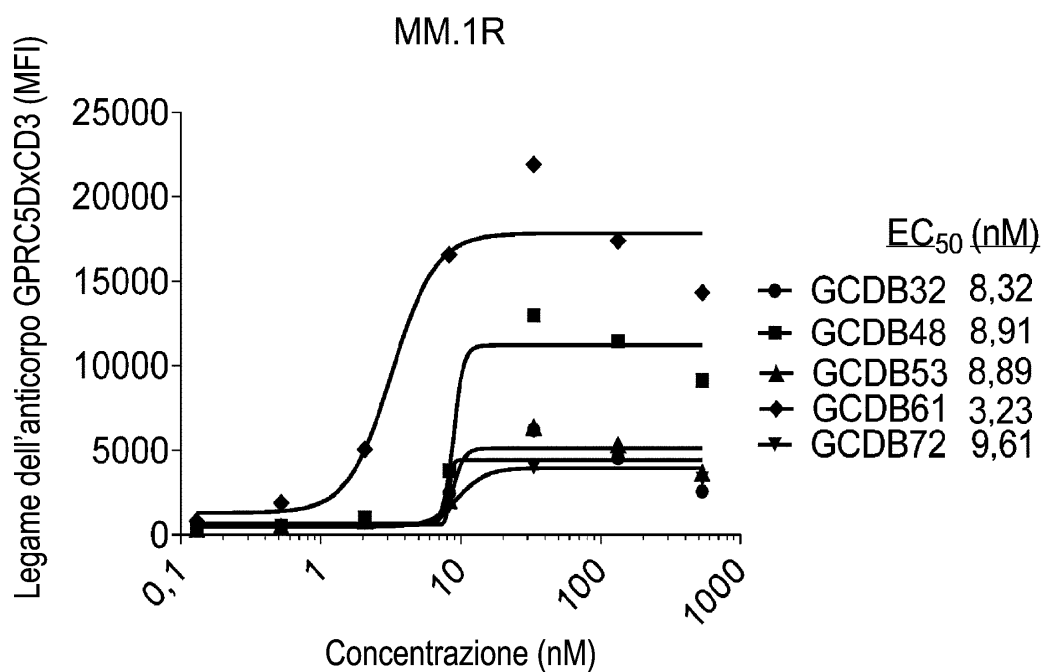


Figura 11C

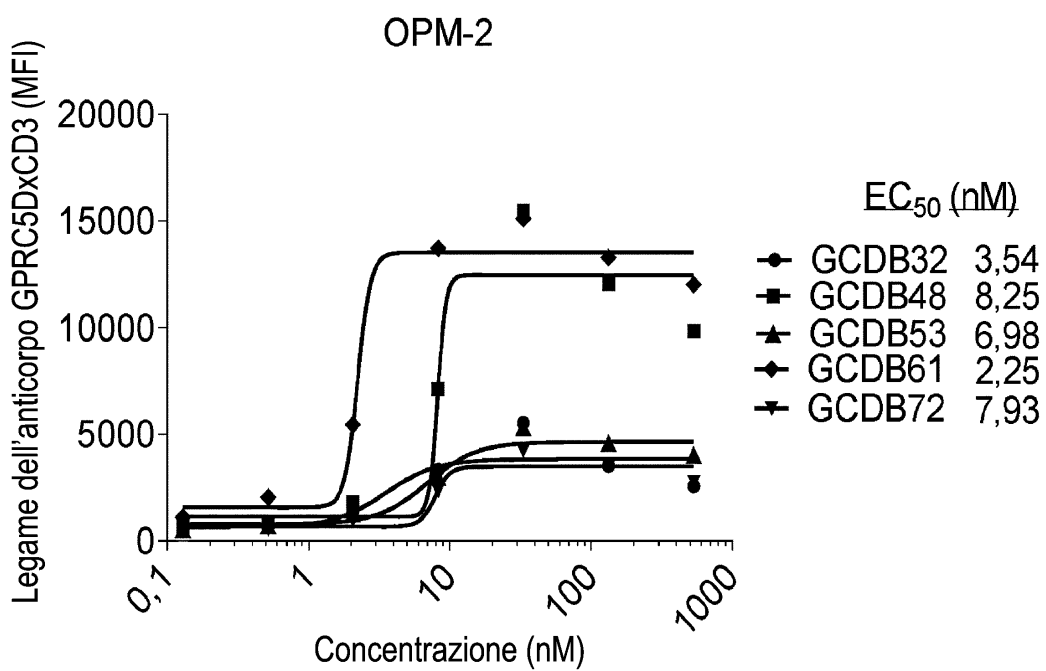


Figura 11D

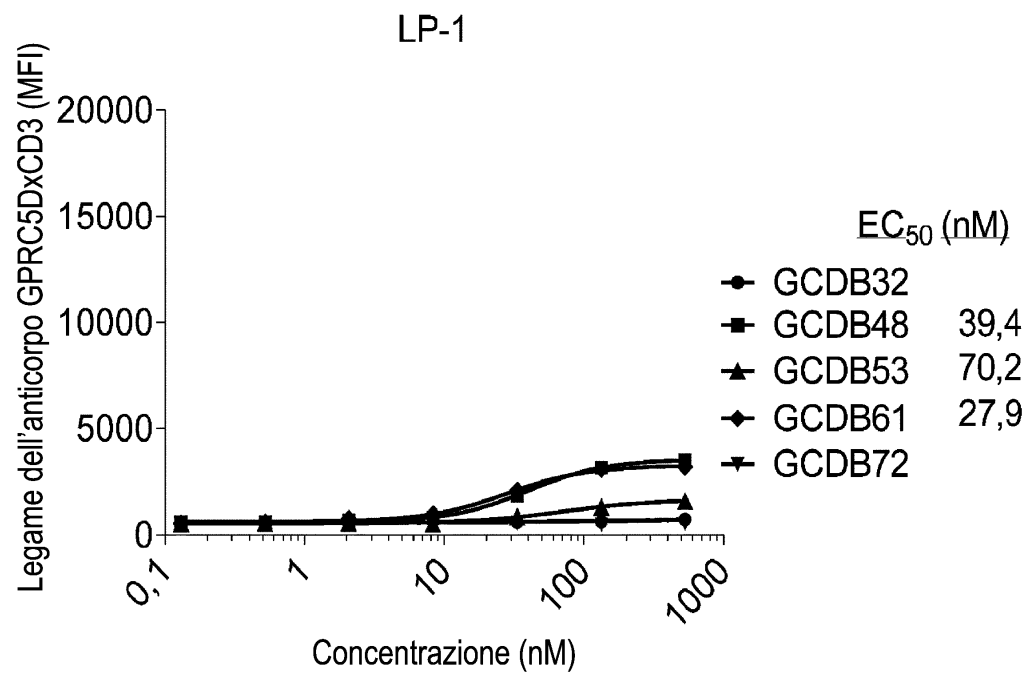


Figura 11E

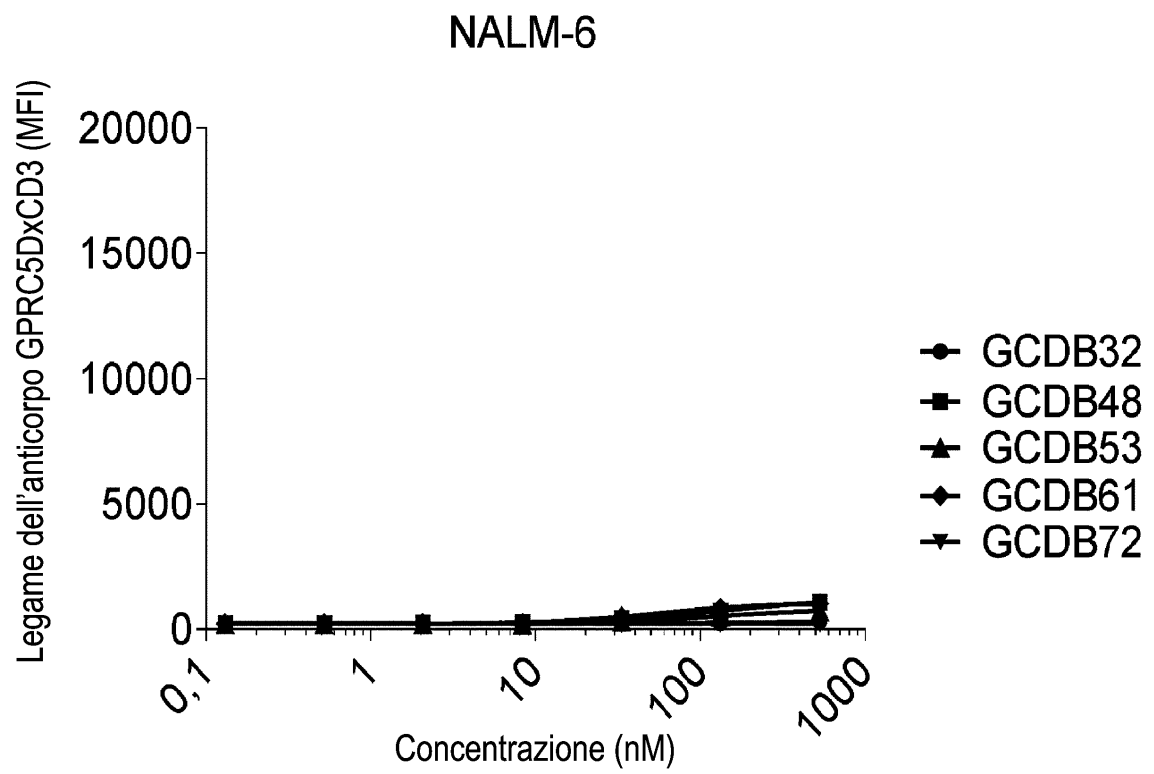


Figura 12A

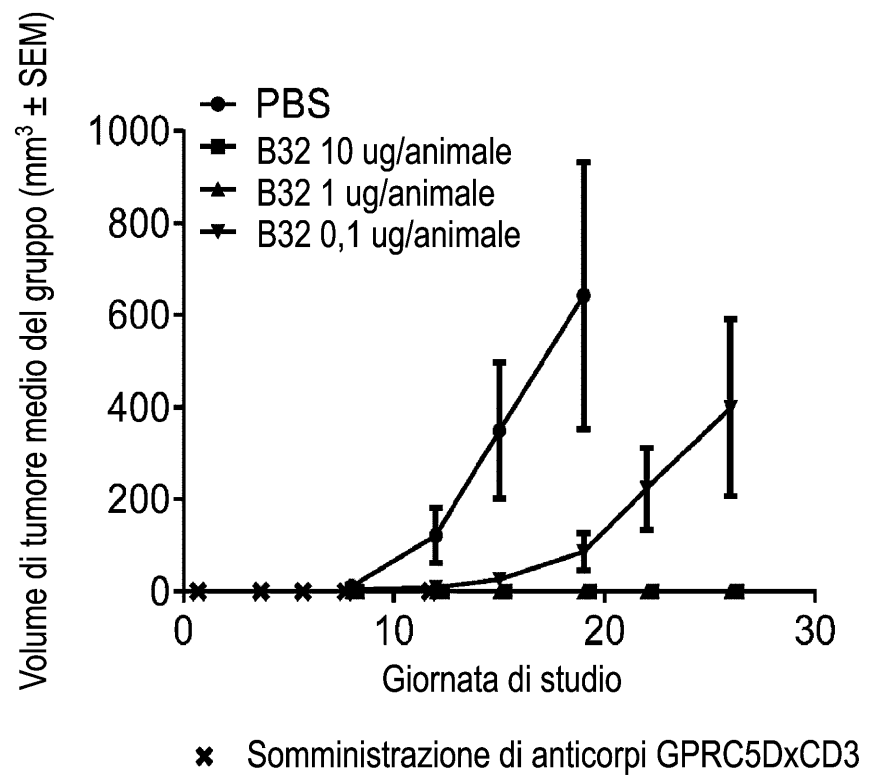


Figura 12B

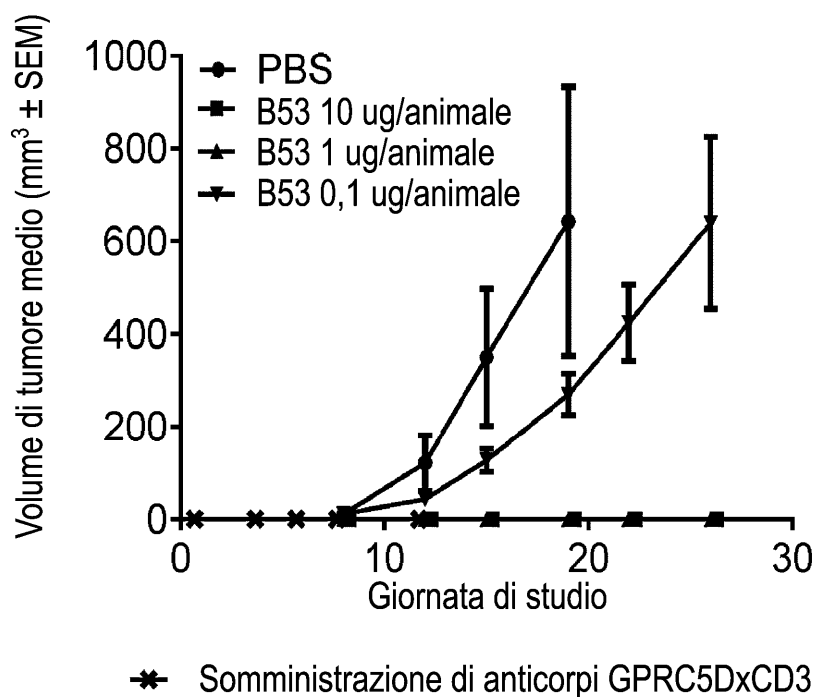


Figura 12C

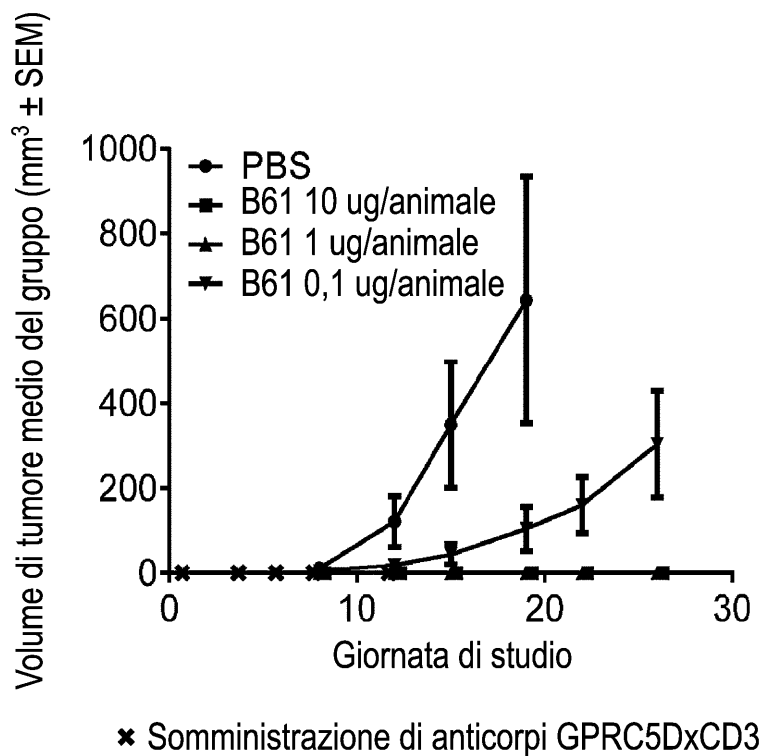


Figura 12D

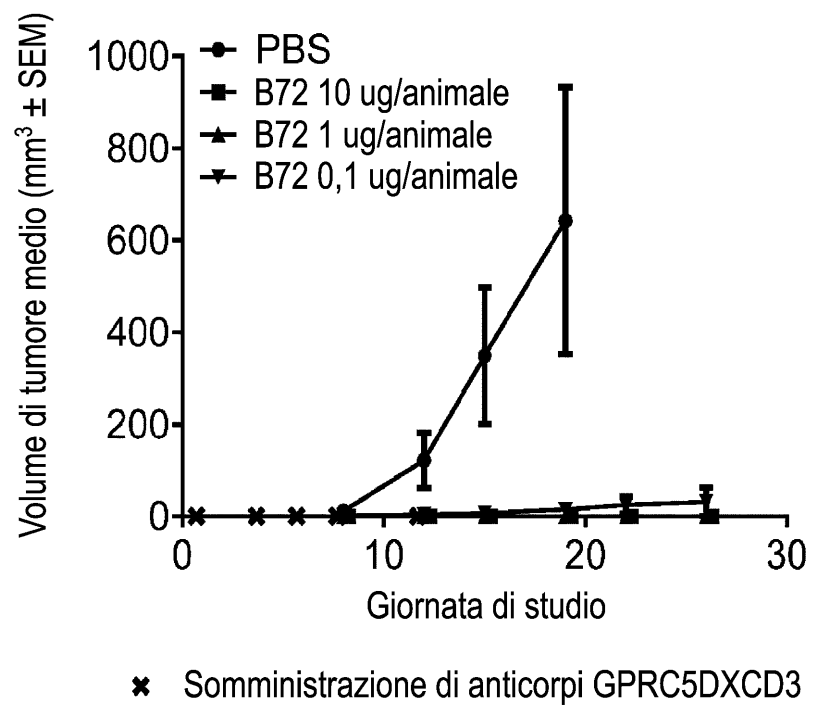
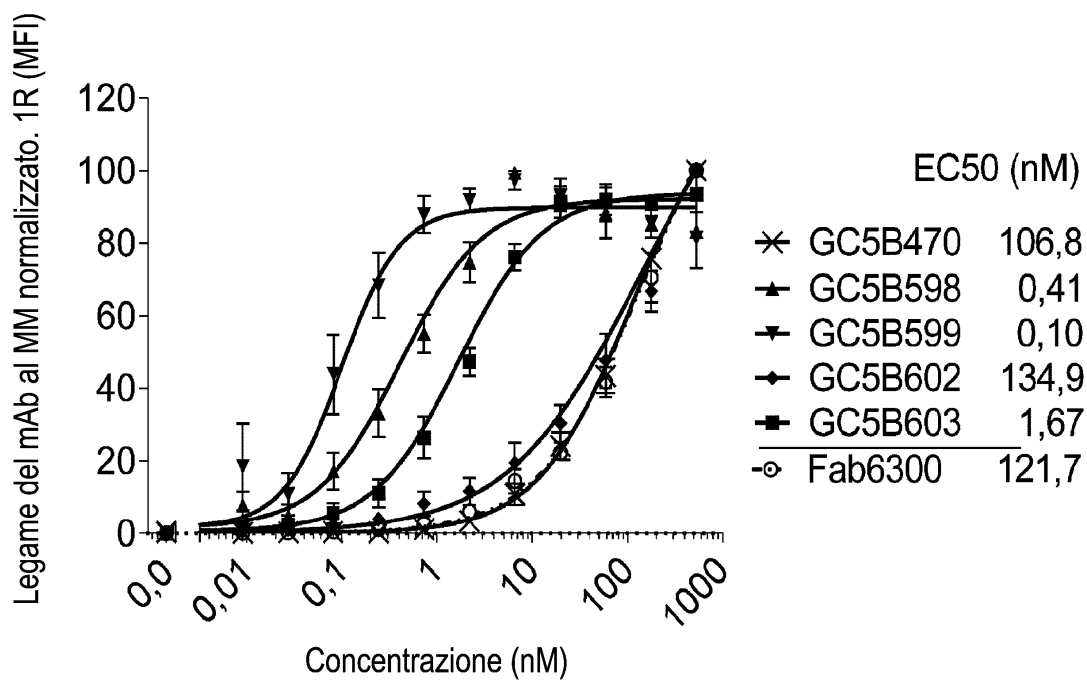


Figura 13



470 GC5M470.GC5B470.002

610 GC5B598 (GC5M610)

611 GC5B599 (GC5M611)

614 GC5B602 (GC5M614)

615 GC5B603 (GC5M615)

Concentrazioni di anticorpi:

µg/mL	0	0,0003	0,001	0,005	0,020	0,078	0,313	1,250	5,000	20,000	80,000
nM	0	0,0020	0,008	0,032	0,130	0,520	2,078	8,313	33,250	133,000	532,000

Figura 14A

FAB6300

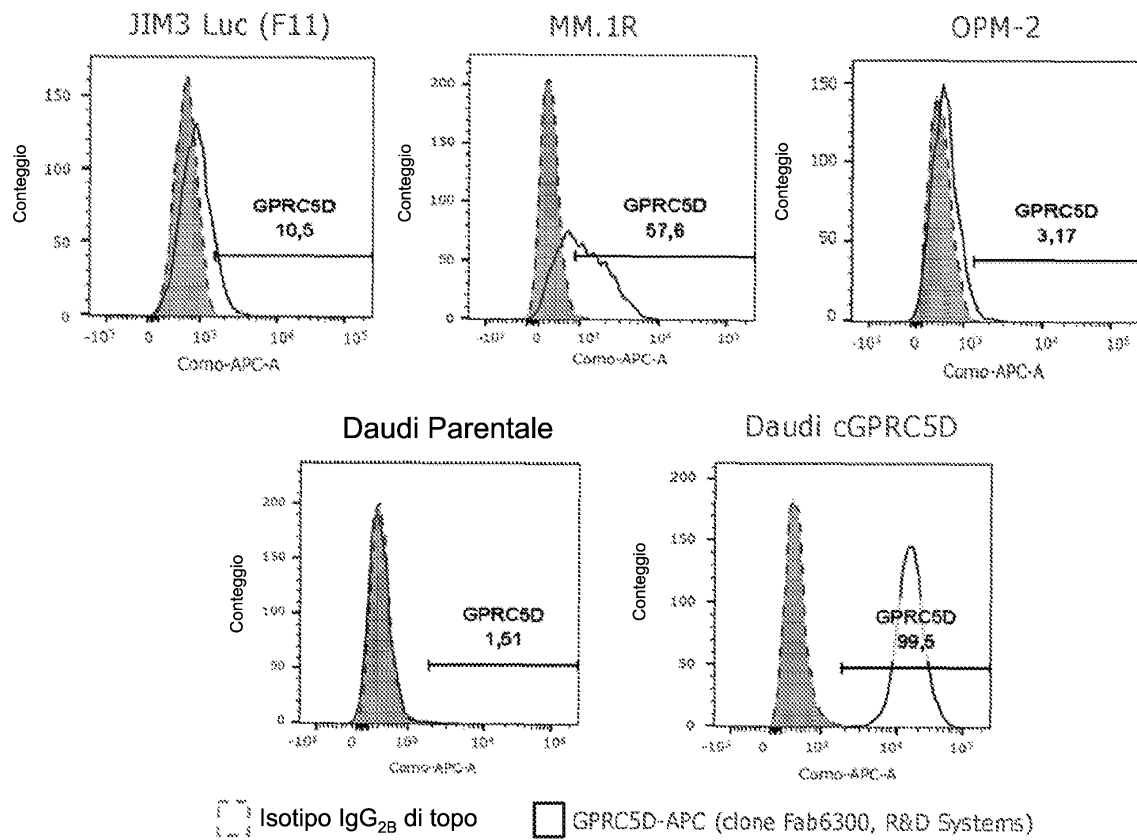


Figura 14A (continua)

GC5M481

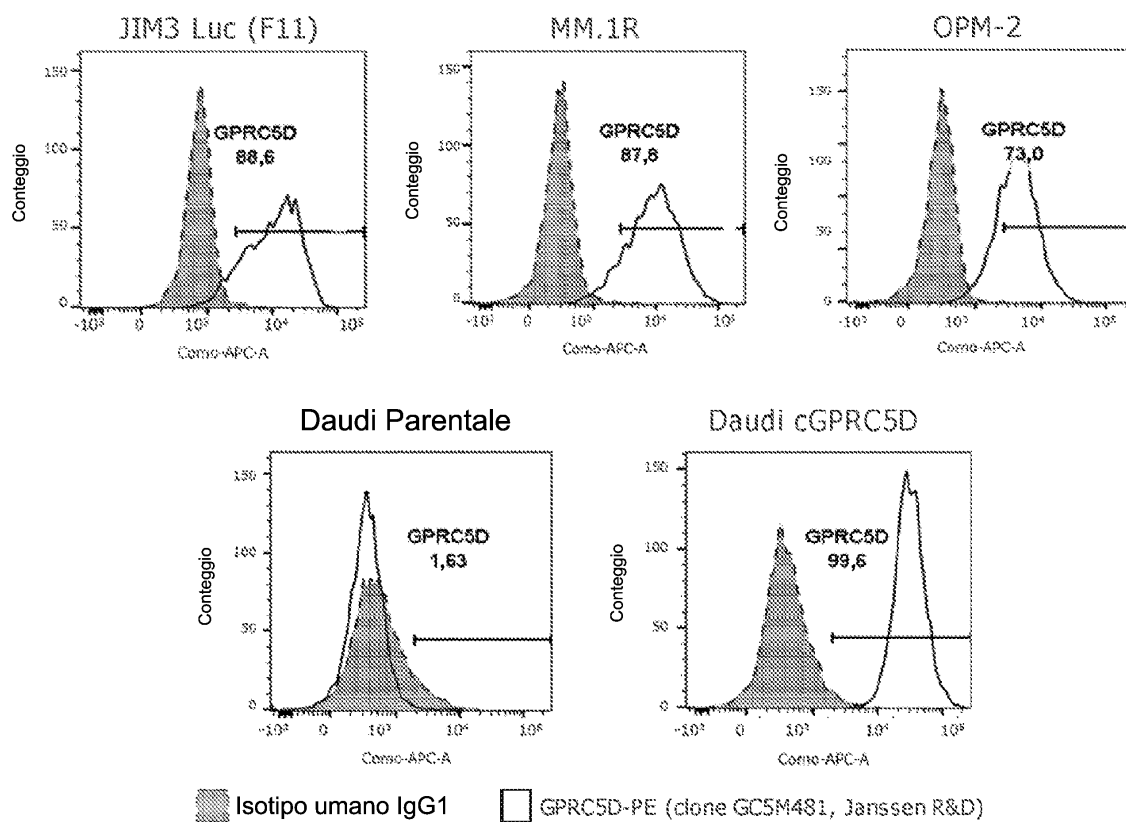


Figura 14B

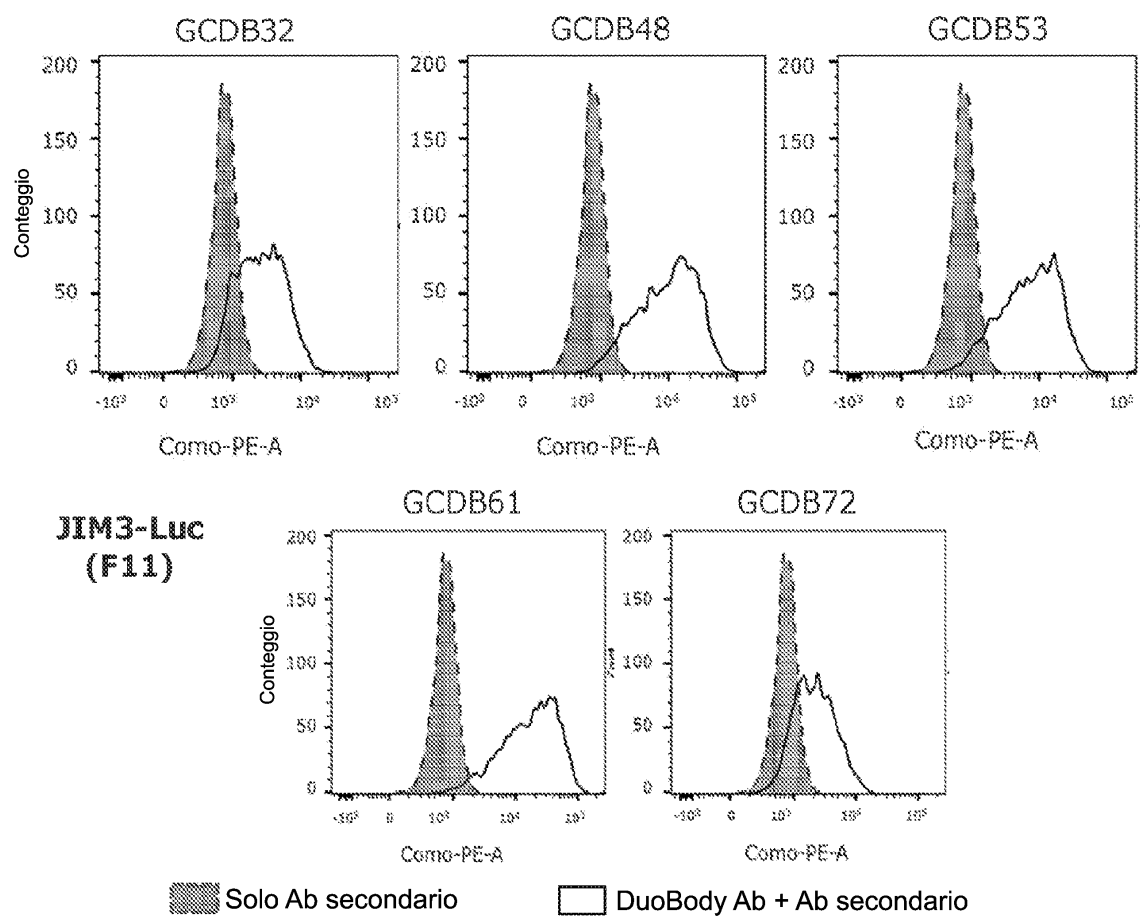


Figura 14B (continua)

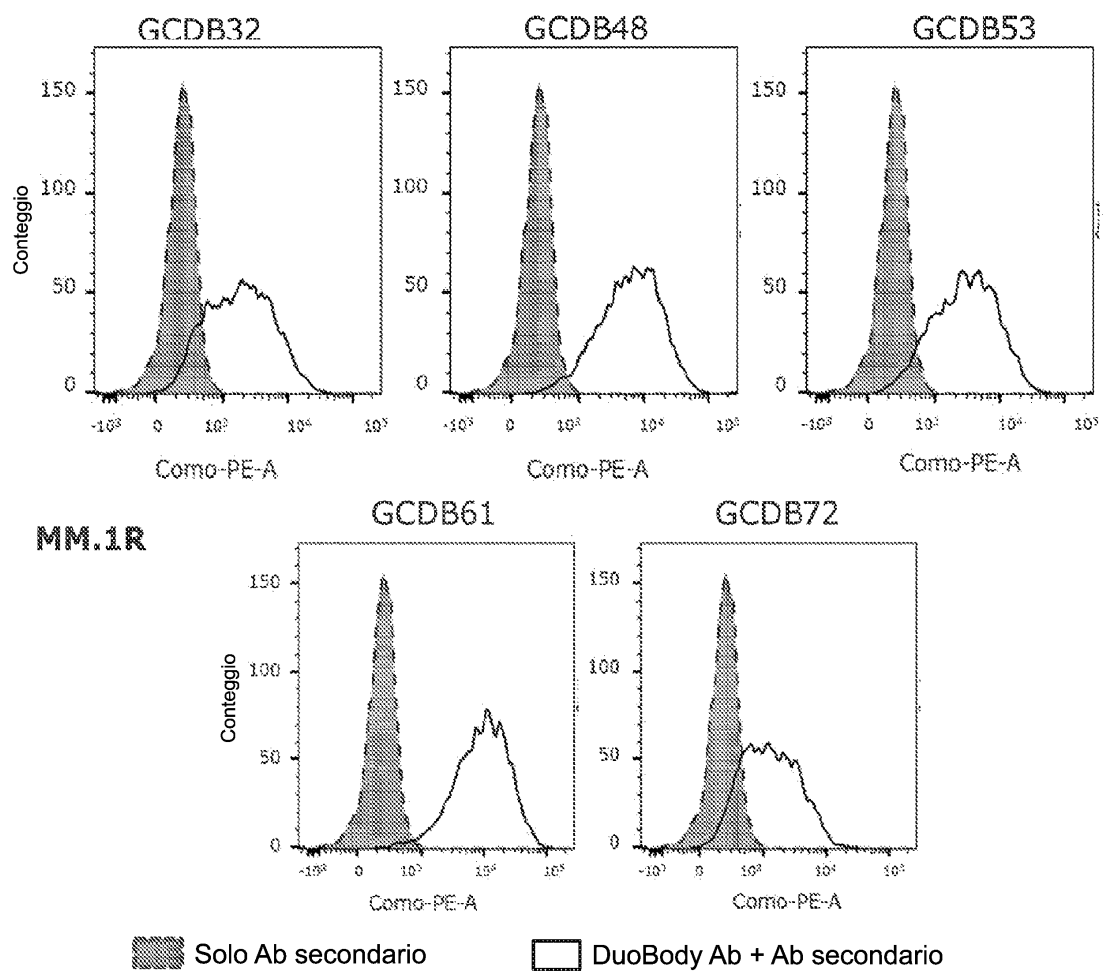


Figura 14B (continua)

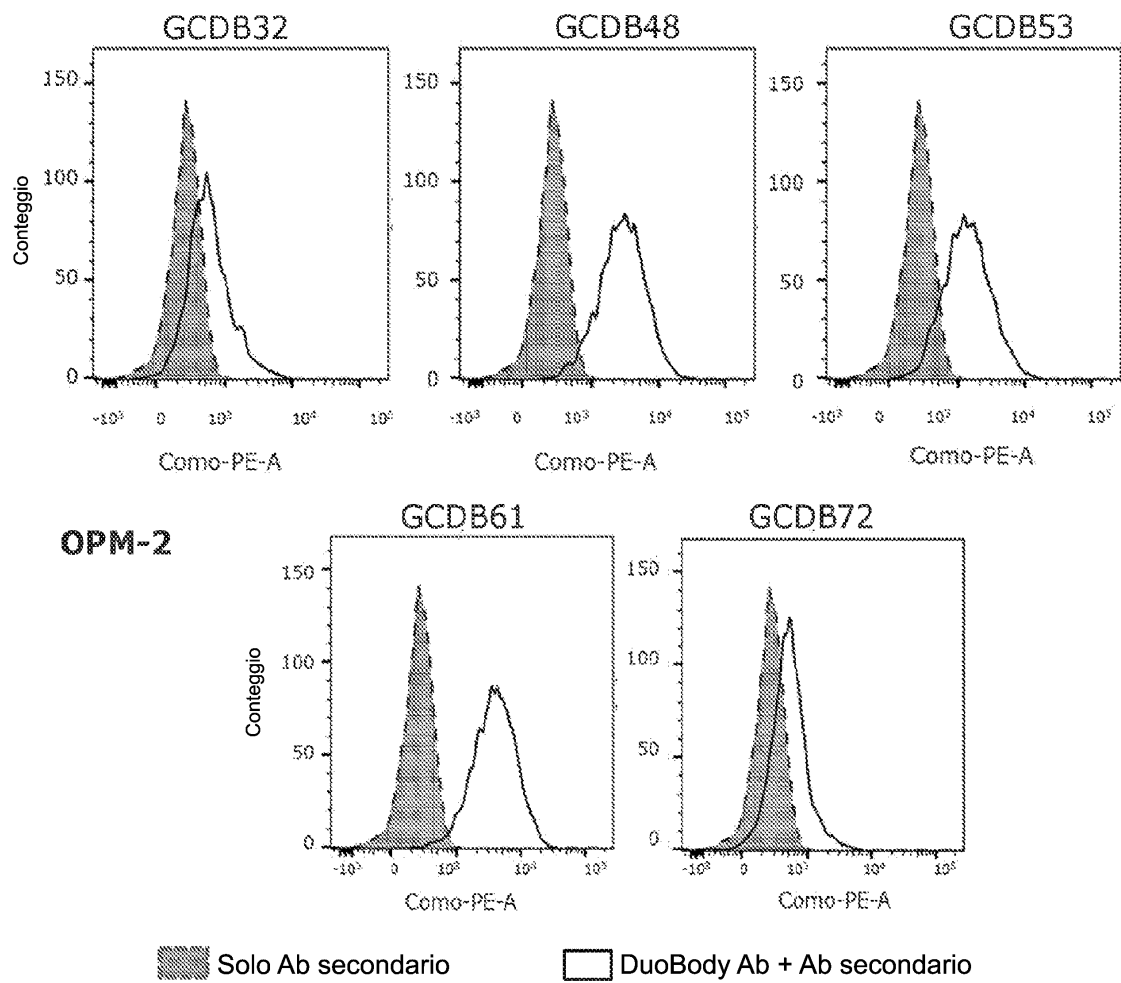


Figura 15A

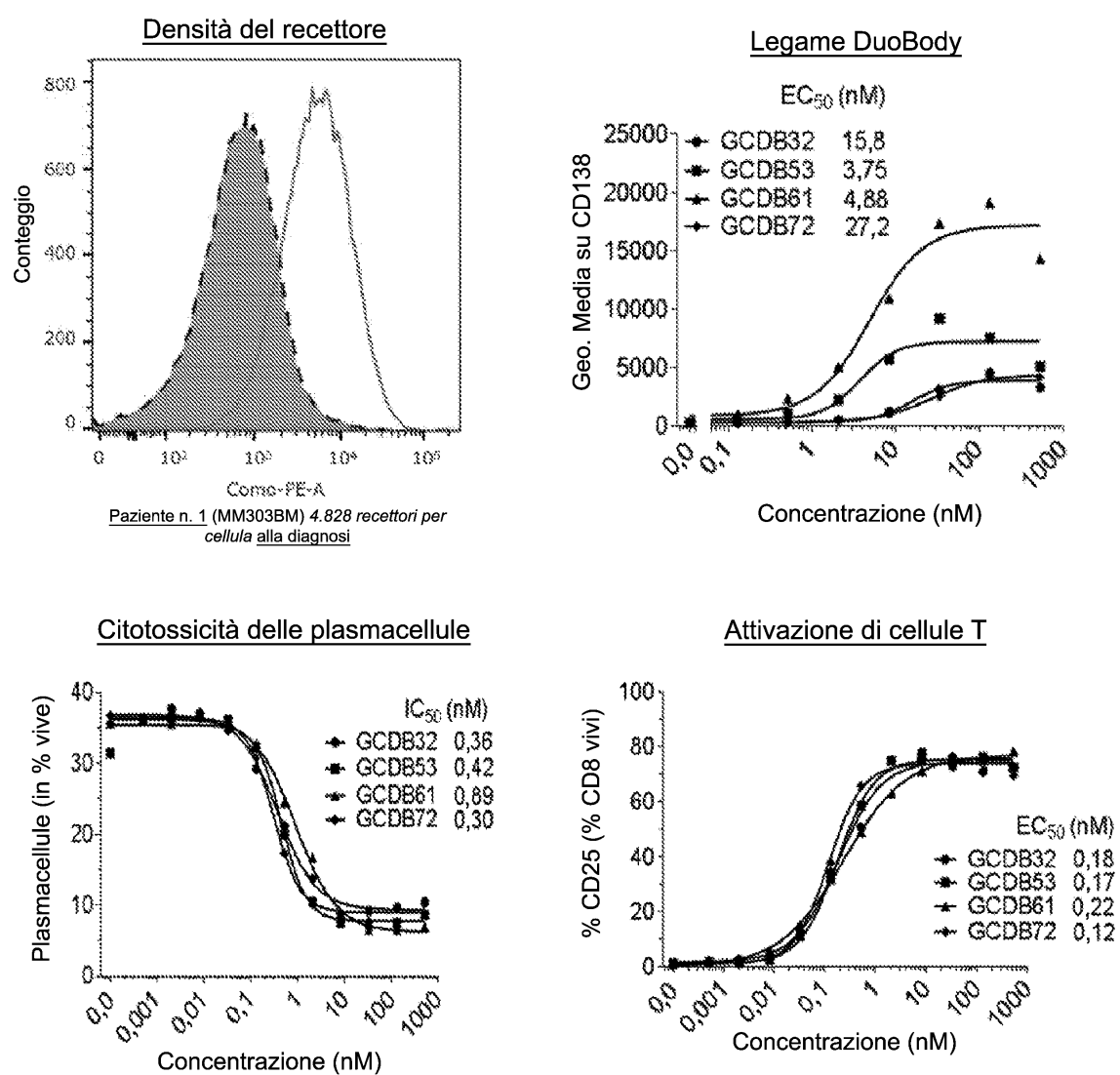


Figura 15B

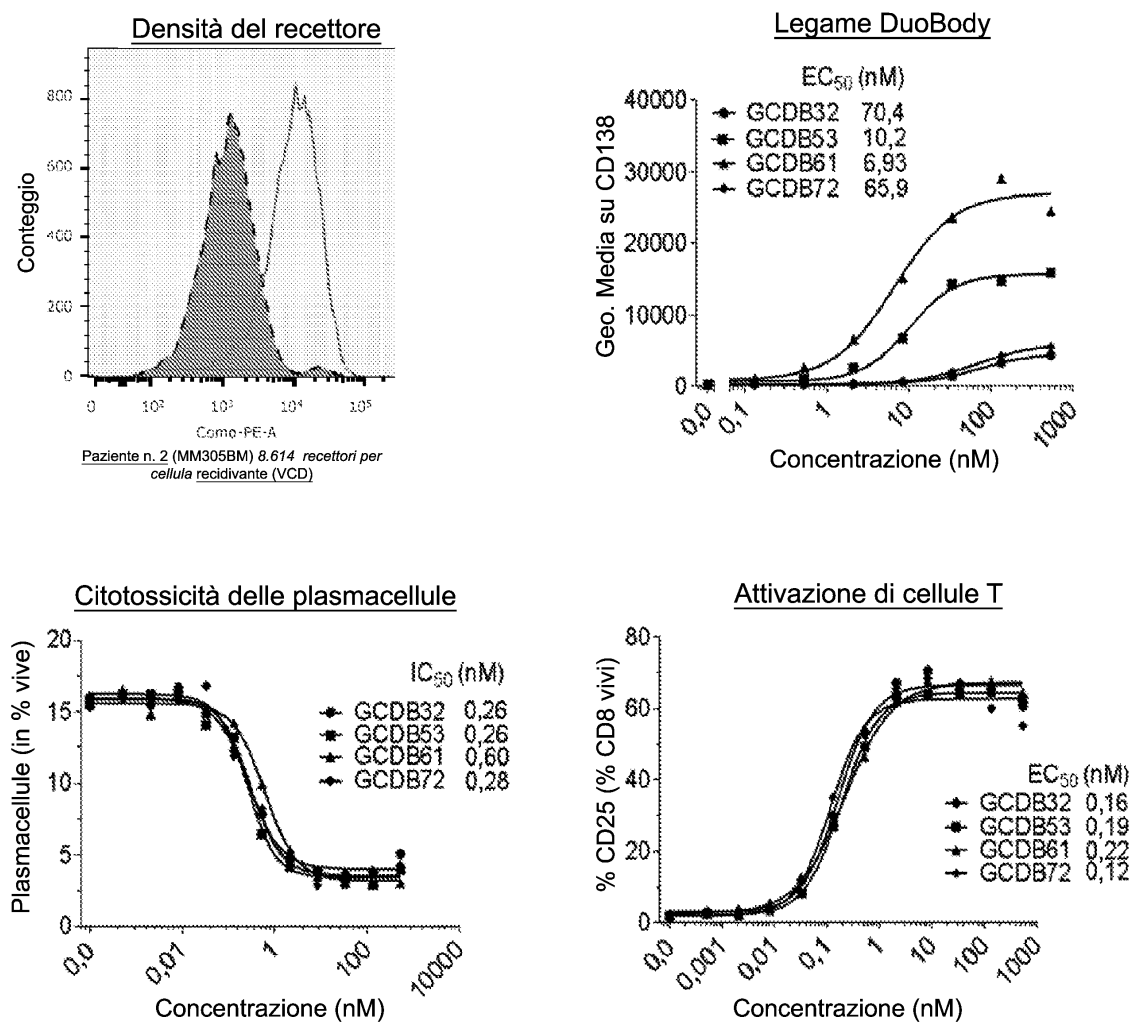


Figura 16

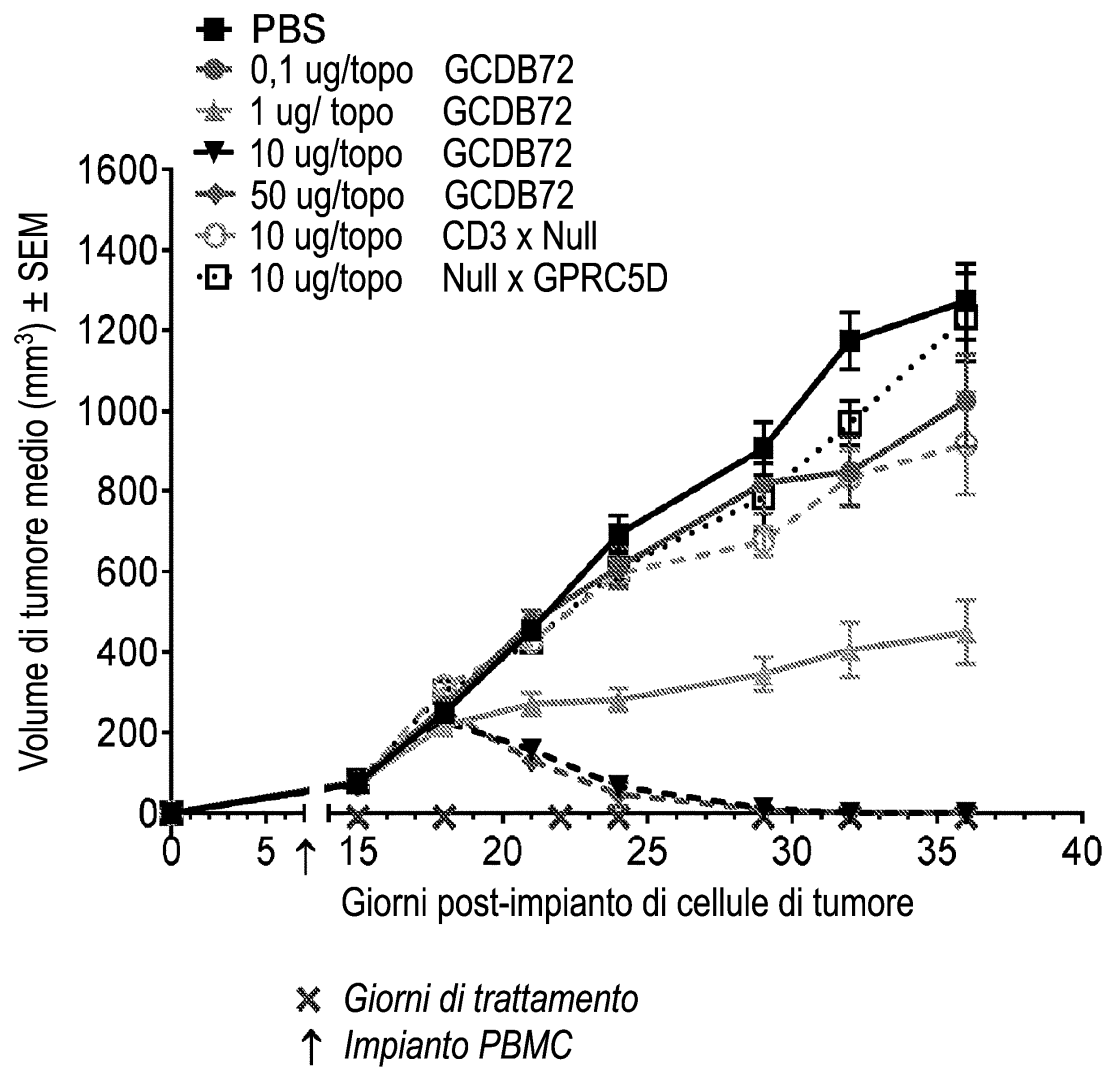


Figura 17

