

Invenția se referă la domeniul moleculelor de legare. În mod specific, se referă la domeniul moleculelor de legare terapeutice pentru tratarea bolilor care implică celule aberante. Mai exact, se referă la molecule de legare care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT.

Cancerul este în continuare o cauză majoră de deces la nivel mondial, în ciuda numeroaselor progrese făcute în tratarea bolilor și a cunoașterii mărite a evenimentelor moleculare care duc la cancer. Cancerul colorectal (CRC), de exemplu, este al treilea cel mai frecvent cancer în lume. În 2008, 1.23 milioane de oameni au fost diagnosticați cu boala. Este al doilea cel mai frecvent cancer în Europa, cu aproximativ 447.000 de cazuri noi diagnosticate în 2012 (13% din total). Cancerul colorectal este a patra cauză de deces cauzat de cancer, estimat a fi responsabil de 608.000 (148.000 în EU) decese anual. Deși au fost propuse câteva tratamente noi în CRC, multe dintre ele au eșuat în testele clinice; CRC metastatic este încă în mare măsură incurabil.

În mod tradițional, cea mai mare parte a descoperirii medicamentelor pentru cancer s-a axat pe agenți care blochează funcții celulare esențiale și distrug celulele care se divid. Totuși, în cazurile de cancer avansat, indiferent cât de agresiv se aplică, chiar și până în punctul în care pacienții suferă efecte secundare ale tratamentului care le pun viața în pericol, chimioterapia rareori duce la vindecare completă. În majoritatea cazurilor, tumorile pacienților se opresc din creștere sau se micșorează temporar (remisiune) doar pentru a începe să crească din nou, uneori mai rapid (recidivă), devenind din ce în ce mai dificil de tratat. Mai recent, punctul central al dezvoltării medicamentelor pentru cancer s-a mutat de la chimioterapia în mare citotoxică la terapii citostatice direcționate cu toxicitate redusă. Tratamentul cancerului avansat cu terapie direcționată care inhibă în mod specific componentele căii de semnalizare a fost validat clinic în leucemie. Totuși, într-o mare parte a carcinoamelor, metodele direcționate se dovedesc încă ineficiente. În cancerul colorectal, peste 80% dintre pacienți supraexprimă tirozin kinaza receptoare EGFR, dar tratamentul cu terapii de blocare EGFR duce la rate de răspuns de ~ 10% și, precum în cazul chimioterapiei, aceste răspunsuri nu sunt durabile. Dacă la unii pacienți rata slabă a răspunsului poate fi asociată cu mutații de activare în aval de agentul de blocare, există tot mai multe dovezi științifice că un tip special de celulă canceroasă cu auto-reînnoire poate explica activitatea limitată a medicamentelor anti-cancer în multe situații.

Celulele stem canceroase sunt celule tumorale care împart unele caracteristici cu celulele stem normale, cel mai important capacitatea de auto-reînnoire în perioade îndelungate de timp și creează multe dintre tipurile celulare dintr-un cancer dat. Dovezi recente sugerează

că, deși chimioterapia convențională și terapiile direcționate actuale distrug celule diferențiate și în curs de diferențiere care formează masa tumorală, celula stem canceroasă cu auto-reînnoire este mai puțin sensibilă la aceste metode terapeutice. Prin urmare, celulele stem canceroase, care formează în mod tipic o subpopulație mică de celule în tumoare, pot fi responsabile de regenerarea bolii după terapie și formarea metastazelor. Se crede că celulele stem canceroase apar din celule stem adulte care au acumulat una sau mai multe mutații care inițiază dezvoltarea cancerului. În celulele stem normale, înmulțirea este strict controlată în spațiu și timp prin semnale transmise în mediul lor imediat. În schimb, celulele stem canceroase se înmulțesc și se diferențiază într-o manieră mai puțin controlată în afara compartimentului celular stem normal, unde sunt dependente de mutații în oncogene și gene supresoare de tumoare.

Fără limitare teoretică, se crede că s-au dezvoltat mijloace și metode care țintesc celule canceroase stem și opresc căile de creștere și diferențiere importante în aceste celule. Țintirea se efectuează folosind proteine care au un braț de legare specific pentru o țintă celulară stem și un alt braț de legare care blochează specific o cale receptoare a factorului de creștere.

Diferite studii au căutat să dezvolte metode sau anticorpi de țintire a căii de semnalizare Wnt. De exemplu, documentul de brevet WO 2014/159580 descrie un anticorp bispecific care țintește pe de-o parte Met uman și pe de altă parte FZD8.

WO 2013/149159 descrie anticorpi anti-LGR5 și imunoconjugăți raportați că țintesc LGR5 pentru diagnostic și tratament.

Morita et al. au raportat în 2004 generarea anticorpilor monoclonali împotriva secvenței 22-141 a LGR5 (Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. Mol Cell Biol. 2004 Nov;24(22):9736-43.) În plus, Peng et al. a raportat în dizertația sa din 2014 că R-spondina 1-4 se leagă de partea N-terminală a LGR5 (A molecular triad governing adult stem cells activation : Crystallographic studies of LGR5, R-spondin 1 and E3 ligase ZNRF3).

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție corespunde obiectului definit în revendicări. În mod specific, prezenta invenție prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT, unde anticorpul bispecific cuprinde domenii variabile care leagă EGFR și LGR5.

Într-un aspect, invenția prevede o proteină care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT. Proteina este de preferință un anticorp, de preferință un anticorp bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia.

Invenția prevede de asemenea un anticorp bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT.

Se divulgă de asemenea o metodă de tratare a unui individ care suferă de un cancer, metoda cuprinzând administrarea unei proteine din invenție sau a unui anticorp bispecific din invenție la individ.

Invenția prevede de asemenea o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție, pentru utilizare în tratarea unui individ având cancer.

Într-o aplicare, cancerul este un cancer care răspunde la ligandul receptorului EGF și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Se prevede de asemenea un sistem celular cuprinzând o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție și o celulă care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Se prevede de asemenea un sistem celular cuprinzând anticorpul bispecific din invenție și o celulă care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT, unde membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) este EGFR și unde membrul asociat cu membrana al căii WNT este LGR5.

Se divulgă de asemenea o metodă de inhibare a creșterii unei celule care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT într-un sistem care permite creșterea celulei, metoda furnizând în sistem o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Se divulgă de asemenea utilizarea anticorpului bispecific din invenție pentru utilizare într-o metodă *in vitro* de inhibare a proliferării unei celule care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT într-un sistem care permite proliferarea celulei, metoda cuprinzând prevederea sistemului cu anticorpul bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia, unde membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) este EGFR și unde membrul asociat cu membrana al căii WNT este LGR5.

Invenția prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39, ale cărei reziduuri aminoacidice D43; G44, M46, F67, G90 și F91 sunt implicate în legarea anticorpului de epitop.

Anticorpul este de preferință un anticorp, unde una sau mai multe dintre substituțiile reziduurilor aminoacidice ale D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A reduc legarea anticorpului LGR5.

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39, și unde legarea anticorpului de LGR5 este redusă de una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A.

Anticorpul este de preferință un anticorp unde interacțiunea anticorpului cu LGR5 pe o celulă care exprimă LGR5 nu inhibă legarea Rspodin 1 (RSPO 1) de LGR5 cu mai mult de 20%. Inhibarea legării anticorpului de LGR5 se măsoară de preferință când anticorpul și RSPO sunt prezenți într-un raport molar de 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001 (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv).

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe LGR5 situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde interacțiunea anticorpului cu LGR5 pe o celulă care exprimă LGR5 nu inhibă legarea unei RSPO de LGR5 cu mai mult de 20% când anticorpul și RSPO sunt prezenți într-un raport molar de 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001 (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv).

Epitopul este de preferință un epitop conformațional. Epitopul este situat de preferință în reziduurile aminoacidice 40-95 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39. Legarea anticorpului de LGR5 este redusă de preferință cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale

reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A. Anticorpul mai cuprinde de preferință un alt domeniu variabil care poate lega o altă proteină. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) sau cMET.

În invenție, anticorpul este un anticorp bispecific.

Anticorpul bispecific cuprinde de preferință un domeniu variabil care poate lega epitopul respectiv pe o parte extracelulară a LGR5 și un domeniu variabil care poate lega o altă proteină. După cum s-a menționat în prezenta, proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGFR sau cMET. Domeniul variabil care leagă această proteină suplimentară leagă de preferință o parte extracelulară a proteinei suplimentare respective.

Invenția prevede de asemenea un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5 și un domeniu variabil care poate lega o altă proteină, unde epitopul LGR5 este situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39, ale cărei reziduuri aminoacidice D43; G44, M46, F67, G90 și F91 sunt implicate în legarea anticorpului. Legarea domeniului variabil de LGR5 este redusă de preferință cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET.

Legarea anticorpului (bi)specific de membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET reduce de preferință semnalizarea indusă de ligand într-o celulă cuprinzând membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET.

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde legarea proteinei de LGR5 este redusă cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A.

Fără limitare teoretică, se crede că M46, F67, G90 și F91 ale LGR5, indicat în figura 39, sunt reziduuri de contact pentru domeniul variabil, i.e. situsul de legare a antigenului al domeniului variabil care poate lega epitopul LGR. Faptul că substituția reziduurilor aminoacidice D43A și G44A reduce legarea anticorpului se poate datora faptului că acestea

sunt reziduuri de contact, dar este de asemenea posibil ca această substituție a reziduurilor aminoacidice să inducă o (ușoară) modificare a structurii părții din LGR care are unul sau mai multe alte reziduuri de contact (i.e. la pozițiile 46, 67, 90 sau 91) și acea modificare a structurii este astfel încât legarea anticorpului este redusă. Epitopul se caracterizează prin substituțiile aminoacidice menționate. Se poate determina în diferite moduri dacă un anticorp leagă același epitop. În exemple se descrie o metodă preferată. Metoda utilizează o celulă CHO. Celulele CHO exprimă LGR5 pe membrana celulară, sau un mutant cu substituție de alanină, de preferință un mutant cuprinzând una sau mai multe dintre substituțiile M46A, F67A, G90A sau F91A. Anticorpul de testare este adus în contact cu celulele CHO și se compară legarea anticorpului de celule. Un anticorp de testare leagă epitopul dacă se leagă de LGR5 și într-o mai mică măsură de o LGR5 cu o substituție M46A, F67A, G90A sau F91A. Se preferă compararea legării cu un grup de mutanți cuprinzând fiecare o substituție de reziduu alanină. Aceste studii de legare sunt bine cunoscute în domeniu. Adesea grupul cuprinde mutanți individuali cu substituție de alanină care acoperă în esență toate reziduurile aminoacidice. Pentru LGR5, grupul trebuie să acopere doar partea extracelulară a proteinei. Expresia unui anumit mutant poate fi compromisă, însă este ușor detectată de unul sau mai mulți anticorpi LGR5 care se leagă de diferite regiuni. Dacă expresia este de asemenea redusă pentru acești anticorpi de control, nivelul sau plierea proteinei pe membrană este compromisă pentru acest mutant specific. Caracteristicile de legare ale anticorpului de testare de grup identifică ușor dacă anticorpii testați prezintă legare redusă de mutanți cu o substituție M46A, F67A, G90A sau F91A și, așadar, dacă anticorpul de testare este un anticorp din invenție. Legarea redusă de mutanți cu o substituție M46A, F67A, G90A sau F91A identifică de asemenea epitopul situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39. Același lucru se aplică poziției în reziduurile aminoacidice 40-95 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39. Într-o aplicare preferată, grupul include un mutant cu substituție D43A; un mutant cu substituție G44A sau ambii. Anticorpul cu secvența VH a VH al MF5816 prezintă legare redusă de acești mutanți de substituție.

Într-o aplicare preferată, interacțiunea RSPO 1 cu LGR5 pe o celulă care exprimă LGR5 nu inhibă legarea anticorpului de LGR5 cu mai mult de 20%. Inhibarea legării anticorpului de LGR5 se măsoară de preferință în condiții în care anticorpul și RSPO 1 sunt prezenți într-un raport molar de 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001, (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv).

Inhibarea legării se măsoară de preferință când anticorpul și RSPO 1 sunt prezenți într-un raport molar de 0,1 sau mai mic, de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,01 (inclusiv).

S-a constatat că raportul molar dintre anticorp și RSPO este mai mic decât 0,001 poate reduce uneori legarea anticorpului de LGR5.

Când se menționează în prezenta raportul molar dintre anticorp și RSPO, se preferă ca anticorpul să fie prezent în cantități care duc la 40%-80% din legarea obținută când sunt prezente cantități de saturare ale anticorpului.

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega

un epitop pe o parte extracelulară a EGFR uman, ale cărei reziduuri aminoacidice I462; G465; K489; I491; N493; și C499 sunt implicate în legarea anticorpului de epitop. Anticorpul este de preferință un anticorp caracterizat prin aceea că legarea anticorpului de EGFR este redusă cu un EGFR în care s-au introdus una sau mai multe dintre substituțiile reziduurilor aminoacidice selectate dintre I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; și C499A.

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a EGFR uman, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 420-480 din SEQ ID NO: 2 indicată în figura 40 și unde legarea anticorpului de EGFR este redusă de una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; și C499A. Legarea anticorpului de EGFR uman perturbază legarea EGF de receptor. Epitopul de pe EGFR este un epitop conformațional.

Epitopul este situat în reziduurile aminoacidice 420-480 din SEQ ID NO: 2 indicată în figura 40, de preferință în 430-480 din SEQ ID NO: 2 indicată în figura 40; de preferință în 438-469 din SEQ ID NO: 2 indicată în figura 40.

Anticorpul cuprinde de preferință un alt domeniu variabil, care poate lega o altă proteină. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Domeniul variabil care leagă EGFR uman este de preferință un domeniu variabil cu o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a VH a MF3755 indicată în figura 1 sau o secvență CDR3 care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a VH a MF3755 indicată în figura 1.

Domeniul variabil care leagă EGFR uman este de preferință un domeniu variabil cu o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale VH a MF3755 indicată în figura 1; sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale VH a MF3755

indicată în figura 1 cu cel mult trei, de preferință cel mult două, de preferință cel mult o substituție aminoacidică.

Domeniul variabil care leagă EGFR uman este de preferință un domeniu variabil cu o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența lanțului VH al MF3755 indicată în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH al MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de lanțul VH al MF3755.

Proteina suplimentară este de preferință LGR4; LGR5; LGR6; RNF43 sau ZNRF3, de preferință LGR5.

Invenția prevede de asemenea un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a EGFR și un domeniu variabil care poate lega o altă proteină, unde epitopul EGFR este situat în reziduurile aminoacidice 420-480 din SEQ ID NO: 2 indicată în figura 40, reziduurile aminoacidice 1462; G465; K489; 1491; N493; și C499 fiind implicate în legarea anticorpului de epitop. Legarea domeniului variabil de EGFR este de preferință redusă cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice I462A; G465A; K489A; I491A; N493A; și C499A. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară, de preferință un membru asociat cu membrana al căii WNT, de preferință LGR5.

Fără limitare teoretică, se crede că reziduurile de contact ale epitopului, i.e. unde domeniul variabil intră în contact cu EGFR uman, sunt probabil 1462; K489; 1491; și N493. Reziduurile aminoacidice G465 și C499 sunt posibil implicate indirect în legarea anticorpului de EGFR, probabil fiindcă mutația prin substituție într-o alanin induce o (ușoară) modificare a structurii epitopului, ducând la o legare redusă de epitop.

S-a arătat că anticorpii cuprinzând unul sau mai multe domenii variabile care leagă EGFR cu epitopul menționat au o mai bună eficiență când se utilizează pentru a inhiba creșterea unei celule sau unui cancer care răspunde la ligandul EGFR. În contextul anticorpilor bispecifici, un braț al anticorpului cuprinzând un domeniu variabil de legare EGFR cu epitopul menționat se combină mai bine cu o varietate de alte brațe cuprinzând domenii variabile care leagă părți extracelulare ale altor proteine de suprafață celulară.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Invenția divulgă o proteină care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și o parte

extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT. O astfel de proteină este denumită de asemenea "o proteină din invenție".

Într-o aplicare preferată, proteina din invenție este un anticorp (sau parte, derivat sau analog de anticorp, așa cum se descrie în altă parte a cererii), un anticorp mimetic, o polipeptidă, un aptamer sau o combinație a acestora. Aceste proteine sau aptameri se leagă în mod tipic de o țintă. Proteina din invenție se leagă de două ținte. Se va înțelege că se poate realiza orice combinație a acestor anticorpi, mimetici de anticorp, polipeptide și aptameri prin metode cunoscute în domeniu. De exemplu, în unele aplicări, proteina din invenție este un conjugat sau o proteină de fuziune. Pentru anticorpi, tehnologia de realizare a anticorpilor multi-specifici a avansat pentru a include și anticorpi bispecifici având aceeași structură generală precum un anticorp mono-specific normal, dar unde cele două brațe ale anticorpului leagă fiecare o țintă diferită.

Un anticorp mimetic este o polipeptidă care, la fel ca anticorpii, poate lega specific un antigen, dar care nu este înrudită structural cu anticorpii. Mimeticii de anticorp sunt de obicei peptide sau proteine artificiale cu o masă molară de circa 3 până la 20 kDa. Avantajele obișnuite față de anticorpi sunt o mai bună solubilitate, pătrunderea în țesut, stabilitate la căldură și enzime și costuri de producție relativ mici. Exemplele nelimitative de mimetici de anticorp sunt molecule affibody (în mod tipic bazate pe domeniul Z al Proteinei A); afile (în mod tipic bazate pe Gamma-B cristalin sau Ubiquitin); afimeri (în mod tipic pe bază de Cystatin); afitine (în mod tipic pe bază de Sac7d din *Sulfolobus acidocaldarius*); alphabody (în mod tipic pe bază de spirală triplu helix); anticaline (în mod tipic pe bază de Lipocaline); avimeri (în mod tipic pe baza domeniilor A ale diferiților receptori membranari); DARPin (în mod tipic pe baza motivului de repetiții ankyrin); fynomer (în mod tipic pe baza domeniului SH3 al Fyn 7); peptide cu domeniu kunitz (în mod tipic pe baza domeniilor Kunitz ale diferiților inhibitori de protează); și monocorpi (în mod tipic pe baza domeniului tip III al fibronectinei).

Monocorpii sunt proteine de legare sintetice construite folosind un domeniu tip III al fibronectinei (FN3) ca matriță moleculară. Monocorpii reprezintă o alternativă simplă și adecvată a anticorpilor pentru crearea proteinelor de legare a țintei. Termenul "monocorp" a fost implementat în 1998 de grupul Koide care a publicat prima lucrare ce demonstrează conceptul monocorpilor folosind al zecelea domeniu FN3 al fibronectinei umane.

Monocorpii și alți mimetici de anticorp sunt generați în mod tipic din biblioteci combinatoriale în care porțiuni ale matriței sunt diversificate folosind prezentare moleculară și tehnologii evolutive direcționate cum ar fi prezentare pe fagi, prezentare mRNA și prezentare

pe suprafața drojdiei. Un număr mare de mimetici de anticorp au afinitate mare și specificitate mare față de țintele lor.

Aptamerii sunt molecule oligonucleotidice sau peptidice care se leagă de o moleculă țintă specifică. Aptamerii sunt creați de obicei prin selecție dintr-o bază mare de secvențe aleatorii, dar există și aptameri naturali în riboswitches. Aptamerii pot fi utilizați atât în scop de cercetare, cât și clinic, ca macromolecule.

În sensul folosit în prezenta, termenul "conjugat" se referă la două sau mai multe molecule care au fost legate covalent, opțional printr-o regiune de legătură. De exemplu, în unele aplicări, un conjugat este o primă fracțiune proteică sau neproteică legată de o a doua fracțiune proteică sau neproteică printr-o regiune de legătură. De exemplu, în unele aplicări ale unei proteine din invenție, cuprinde sau constă din doi sau mai mulți anticorpi care au fost legați covalent. Un conjugat nu se limitează la o primă și o a doua fracțiune, ci în unele aplicări poate avea o a treia, a patra sau mai multe fracțiuni legate prin regiuni de legătură. Așa cum se descrie în altă parte în prezenta cerere, exemplele de fracțiuni proteice includ, nelimitativ: o polipeptidă, un peptidomimetic sau un anticorp (sau parte, derivat sau analog de anticorp, așa cum se descrie în altă parte a cererii). Exemplele de fracțiuni neproteice includ, nelimitativ, aptameri. Se pot folosi numeroase tipuri de linker și linkerul va fi selectat în funcție de tipurile de molecule din conjugat și de proprietățile dorite ale linkerului (lungime, flexibilitate, rezistența la activitatea proteazei și alte caracteristici similare). Acești linkeri pot cuprinde nucleotide, polipeptide sau un material sintetic adecvat. De exemplu, un linker poate fi un linker peptidic flexibil. În anumite aplicări, linkerul poate fi un linker clivabil, permițând separarea părților conjugatului. În alte aplicări, un linker peptidic poate fi un linker în spirală. Se cunosc în domeniu diferite exemple și kituri de legare a proteinelor și a altor molecule. În sensul folosit în prezenta, termenul "proteină de fuziune" se referă la o proteină cuprinzând două sau mai multe polipeptide sau proteine legate la nivel de ADN prin recombinare și exprimate împreună ca o singură polipeptidă. O proteină de fuziune poate cuprinde de asemenea o regiune de legare a peptidelor codificată de asemenea de ADN și exprimată împreună cu proteina de fuziune. Un linker peptidic care face parte dintr-o proteină de fuziune poate fi proiectat să aibă caracteristici specifice precum flexibilitate, hidrofilicitate, rezistență la protează, clivabilitate etc. Toate aceste proprietăți pot fi proiectate în secvența ADN și metodele de proiectare a linkerilor sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, anticorpii pot fi legați prin metode bine cunoscute în domeniu și, așa cum se descrie în prezenta, pentru a forma anticorpi bispecfici sau multi-specfici. În plus, anticorpii bispecfici pot fi realizați prin diferite metode cunoscute în domeniu, de exemplu, folosind tehnologii cum ar fi BiClonics®.

Un anticorp monoclonal bispecific (BsMAb, BsAb) cuprinde în mod tipic domenii de legare a doi anticorpi monoclonali diferiți și, în consecință, se leagă de doi epitopi diferiți. Moleculele Biclomics®, dar și alți anticorpi bispecifici IgG în lungime completă au două specificități diferite de legare a antigenului codificate de două regiuni variabile diferite ale unei molecule IgG în lungime completă a unui Fab al unui scFv. Biclomics® pot fi produse prin co-transfecția celulelor individuale cu constructe genetice care codifică doi anticorpi diferiți cu lanț ușor comun (cLC) așa cum se detaliază în altă parte în prezenta. Modificarea CH3 asigură heterodimerizare eficientă și formarea anticorpilor bispecifici în esență puri. În unele aplicări, o proteină din invenție suprimă semnalizarea într-o celulă, un grup de celule, un țesut sau o tumoră la un nivel util pentru obiectivul prevăzut al proteinei din invenție, de exemplu, poate reduce inducerea oricărui unul sau mai multor răspunsuri cu cel puțin 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferință 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mai preferabil 70%, 80%, 85%, cel mai preferabil 90%, 95%, 99% sau 100% comparativ cu semnalizarea indusă de o substanță neutră sau un control negativ, măsurată într-un test cunoscut în prezenta.

O proteină din invenție cuprinde de preferință un anticorp sau o parte, un derivat sau analog al acestuia. O proteină din invenție este de preferință un anticorp bispecific.

Anticorpul își leagă în mod tipic ținta prin așa numitul situs de legare a antigenului. Un situs de legare a antigenului nemodificat este format în mod tipic și prezent în domeniul variabil al anticorpului. Domeniul variabil conține situsul de legare a antigenului. Un domeniu variabil care leagă un antigen este un domeniu variabil cuprinzând un situs de legare a antigenului care leagă antigenul.

Într-o aplicare, un domeniu variabil al anticorpului cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (VH) și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL). Situsul de legare a antigenului poate fi prezent în domeniul variabil VH/VL combinat sau numai în regiunea VH sau numai în regiunea VL. Când situsul de legare a antigenului este prezent numai în una din cele două regiuni ale domeniului variabil, regiunea variabilă omoloagă poate contribui la pliarea și/sau stabilitatea regiunii variabile de legare, dar nu contribuie semnificativ la legarea antigenului.

În sensul folosit în prezenta, legarea antigenului se referă la capacitatea de legare tipică a unui anticorp de antigenul său. Legarea unui anticorp de un antigen poate fi evaluată în diferite moduri. O modalitate este incubarea anticorpului cu antigenul (de preferință celule care exprimă antigenul), îndepărtarea anticorpului nelegat (de preferință printr-o etapă de spălare) și detectarea

anticorpului legat prin intermediul unui anticorp marcat care se leagă anticorpul legat.

Legarea antigenului de un anticorp este mediata în mod tipic prin regiunile determinante de complementaritate (CDR) ale anticorpului și structura tridimensională specifică atât a antigenului, cât și a domeniului variabil, permițând acestor două structuri să se lege cu precizie (o interacțiune asemănătoare cu o broască și o cheie), spre deosebire de aderarea aleatorie, nespecifică, a anticorpilor. Dat fiind că un anticorp recunoaște în mod tipic o parte a unui antigen denumită epitopul unui antigen și că un astfel de epitop poate fi prezent și în alți compuși, anticorpii conform prezentei invenții pot recunoaște și alte proteine, dacă acești alți compuși conțin același epitop. Prin urmare, termenul "legare" nu exclude legarea anticorpilor de o altă proteină sau proteine care conțin același epitop. Aceste alte proteine nu sunt de preferință proteine umane.

O proteină din invenție, cum ar fi un anticorp, nu se leagă în mod tipic de alte proteine decât proteina țintă specificată pe membrana celulelor postnatal, de preferință la un om adult.

Un anticorp din invenție cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) se leagă de membrul specificat și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de partea extracelulară a unui alt membru al familiei receptorilor EGF din aceeași specie. De exemplu, un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de ErbB-1, se leagă de ErbB-1 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorii omologi ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) și ErbB-4 (HER4) din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de ErbB-2, se leagă de ErbB-2 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorii omologi ErbB-1, ErbB-3 și ErbB-4 din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de ErbB-3, se leagă de ErbB-3 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorii omologi ErbB-1, ErbB-2 și ErbB-4 din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de ErbB-4, se leagă de ErbB-4 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorii omologi ErbB-1, ErbB-2 și ErbB-3 din aceeași specie. Desigur, când un anticorp este proiectat să se lege de doi sau mai mulți membri ai familiei, legarea de cei doi sau mai mulți membri poate fi în esență identică. În prezenta invenție, se preferă ca anticorpii să se lege fiecare doar de un membru al unei familii. Ținând cont de faptul că familia ErbB este o familie de receptori de suprafață celulară, legarea este evaluată în mod tipic pe celule care exprimă receptor(i) pe suprafața lor celulară.

Un anticorp din invenție de preferință perturbază legarea unui ligand pentru membrul familiei receptorilor EGF. Termenul "perturbă legarea", în sensul folosit în prezenta,

înseamnă că legarea anticorpului de membrul familiei receptorilor EGF concurează cu ligandul pentru legare de membrul familiei receptorilor EGF. Anticorpul poate diminua legarea ligandului, poate deplasa ligandul când acesta este deja legat de membrul familiei receptorilor EGF sau poate preveni cel puțin parțial, de exemplu prin împiedicare sterică, legarea ligandului de membrul familiei receptorilor EGF.

O proteină de legare EGFR (ErbB1) sau HER3 (ErbB3) din invenție, de preferință anticorpul din invenție inhibă de preferință ligandul EGFR sau semnalizarea indusă de ligandul HER3, măsurată ca o creștere indusă de ligand a celulelor BxPC3 (ATCC CRL-1687) sau celulelor BxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058) sau moartea indusă de ligand a celulelor A431 (ATCC CRL-1555). Proteina de legare EGFR sau HER3 menționată poate reduce semnalizarea indusă de ligand cu cel puțin 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferință 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mai preferabil 70%, 80%, 85% și cel mai preferabil 90%, 95%, 99% sau 100% în comparație cu efectul indus de ligand în prezența unei substanțe neutre sau a unui control negativ, măsurat într-un test cunoscut în domeniu. EGFR și ErbB-3 pot lega fiecare un număr de liganzi și stimulează creșterea celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 menționate. În prezența unui ligand pentru unul sau ambii receptori, creșterea celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este stimulată. Creșterea indusă de ligand EGFR și/sau ErbB-3 a celulelor BxPC3 poate fi măsurată comparând creșterea celulelor în absența și prezența ligandului. Ligandul EGFR preferat pentru măsurarea creșterii induse de ligand EGFR a celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este EGF. Ligandul ErbB-3 preferat pentru măsurarea creșterii induse de ligand ErbB-3 a celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este NRG1. Creșterea indusă de ligand se măsoară de preferință folosind cantități de saturare de ligand. Într-o aplicare preferată, EGF se utilizează într-o cantitate de 100ng/ml de mediu de cultură. NRG1 se utilizează de preferință în 10ng/ml de mediu de cultură. EGF și NRG1 sunt de preferință EGF și NRG1 de la R&D systems, cat. nr. 396-HB și 236-EG, așa cum se descrie în exemple. Se preferă ca metoda descrisă în prezenta mai sus, pentru determinarea dacă o proteină sau un anticorp din invenție inhibă semnalizarea în format bivalent, să se efectueze cu o versiune monovalentă sau bivalentă monospecifică a proteinei sau anticorpului, cu alte cuvinte o proteină sau un anticorp care are doar situsuri de legare pentru receptorul a cărui semnalizare se determină. Pentru un anticorp, ar fi un anticorp monospecific bivalent, unde domeniile variabile de legare a antigenului constau din domenii variabile care leagă membrul familiei receptorilor EGF.

O proteină de legare EGFR sau HER3 din invenție, de preferință anticorpul din invenție, inhibă de preferință creșterea indusă de ligand EGFR sau ligand HER3 a celulelor BxPC3 (ATCC CRL-1687) sau BxPC3-luc2 (Perkin Elmer 125058). Proteina de legare EGFR sau

HER3 menționată poate reduce creșterea indusă de ligand cu cel puțin 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferință 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mai preferabil 70%, 80%, 85% și cel mai preferabil 90%, 95%, 99% sau 100% în comparație cu creșterea indusă de o substanță neutră sau un control negativ, măsurată într-un test cunoscut în domeniu. EGFR și ErbB-3 pot lega fiecare un număr de liganzi și stimulează creșterea celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 menționate. În prezența unui ligand pentru unul sau ambii receptori, creșterea celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este stimulată. Creșterea indusă de ligand EGFR și/sau ErbB-3 a celulelor BxPC3 poate fi măsurată comparând creșterea celulelor în absența și prezența ligandului. Ligandul EGFR preferat pentru măsurarea creșterii induse de ligand EGFR a celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este EGF. Ligandul ErbB-3 preferat pentru măsurarea creșterii induse de ligand ErbB-3 a celulelor BxPC3 sau BxPC3-luc2 este NRG1. Creșterea indusă de ligand se măsoară de preferință folosind cantități de saturare de ligand. Într-o aplicare preferată EGF se utilizează într-o cantitate de 100ng/ml de mediu de cultură. NRG1 se utilizează de preferință în 10ng/ml de mediu de cultură. EGF și NRG1 sunt de preferință EGF și NRG1 de la R&D systems, cat. nr. 396-HB și 236-EG așa cum se descrie în exemple.

Un ligand al familiei receptorilor EGF este de preferință un ligand al E receptorilor GFR sau HER3. "Ligandul HER3 sau ErbB-3", în sensul folosit în prezenta, se referă la polipeptide care leagă și activează ErbB-3. Exemplele de liganzi ErbB-3 includ, nelimitativ, neuregulin 1 (NRG1) și neuregulin 2 (NRG2) (vezi Olayioye MA et al.; EMBO J (2000) Vol 19: pp 3159-3167). Termenul include de preferință fragmente și/sau variante biologice active ale unei polipeptide naturale. "Ligandul EGFR sau ErbB-1", în sensul folosit în prezenta, se referă la polipeptide care leagă și activează EGFR. Exemplele de liganzi EGFR includ, nelimitativ, EGF, TGF- α , HB-EGF, amphiregulin, betacellulin și epiregulin (vezi Olayioye MA et al.; EMBO J (2000) Vol 19: pp 3159-3167). Termenul include de preferință fragmente și/sau variante biologice active ale unei polipeptide naturale.

Un anticorp din invenție cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de partea extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT se leagă de membrul specificat și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de partea extracelulară a unei alte proteine asociate cu membrana care nu este un membru al unei căi de semnalizare WNT din aceeași specie, cum ar fi receptorul pentru factorul de creștere tip insulenic 1 (IGF-1). Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de LGR5, se leagă de LGR5 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de o parte extracelulară a unui receptor IGF-1 din aceeași specie.. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de LGR4, se leagă de LGR4 și, în condiții altfel identice,

cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorul IGF-1 din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de RNF43, se leagă de RNF43 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorul IGF-1, LGR4 sau LGR5 din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de ZNRF3, se leagă de ZNRF3 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de receptorul IGF-1 sau RNF43 din aceeași specie. Desigur, când un anticorp este proiectat să se lege de doi sau mai mulți membri ai familiei, legarea de cei doi sau mai mulți membri poate fi în esență identică. De exemplu, unii dintre anticorpii care leagă LGR5 pot lega LGR4 din aceeași specie și vice versa. Într-o aplicare preferată, un anticorp din invenție cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de partea extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT se leagă de membrul specificat și, în condiții altfel identice, cel puțin de 100 de ori mai puțin de partea extracelulară a unui alt membru asociat cu membrana al familiei din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de LGR5, se leagă de LGR5 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 10 ori și de preferință cel puțin de 100 de ori mai puțin de LGR4 din aceeași specie. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care se leagă de LGR4, se leagă de LGR4 și, în condiții altfel identice, cel puțin de 10 ori și de preferință cel puțin de 100 de ori mai puțin de LGR5 din aceeași specie. În prezenta invenție se preferă ca respectivii anticorpi să se lege fiecare numai de un membru al unei familii. Membrii preferați ai căii de semnalizare WNT, în contextul prezentei invenții, sunt LRP5, LRP6, LGR4, LGR5, LGR6, FRZ1, FRZ2, FRZ3, FRZ4, FRZ5, FRZ6, FRZ7, FRZ8, FRZ9, FRZ10, ZNRF3, RNF43, N-Cadherin, Kremen1 și Kremen2, ROR2/RYK). Având în vedere că membrii din această listă sunt receptori de suprafață celulară, legarea este evaluată în mod tipic pe celule care exprimă receptor(i) pe suprafața lor celulară.

Termenul "anticorp", în sensul folosit în prezenta, înseamnă o moleculă proteinacee, de preferință aparținând clasei imunoglobulinice a proteinelor, conținând unul sau mai multe domenii variabile care leagă un epitop pe un antigen, unde aceste domenii provin din sau împart omologie secvențială cu domeniul variabil al unui anticorp. Anticorpii de uz terapeutic sunt de preferință cât mai apropiați de anticorpii naturali ai subiectului tratat (de exemplu anticorpi umani pentru subiecți umani). Legarea anticorpului poate fi exprimată prin specificitate și afinitate. Specificitatea determină antigenul sau epitopul acestuia care este legat specific de domeniul de legare. Afinitatea măsoară intensitatea legării de un anumit antigen sau epitop. Legarea specifică este definită ca legare cu afinități (KD) de cel puțin 1×10^{-6} M, mai preferabil 1×10^{-7} M, mai preferabil peste 1×10^{-9} M. În mod tipic, anticorpii pentru aplicări terapeutice au afinități de până la 1×10^{-10} M sau mai mari. Anticorpii, cum ar fi anticorpii

bispecifici din prezenta invenție, cuprind în mod tipic domeniile constante (partea Fc) ale unui anticorp natural. Un anticorp din invenție este în mod tipic un anticorp bispecific în lungime completă, de preferință din subclasa IgG umană. Un anticorp din prezenta invenție este de preferință din subclasa IgG1 umană. Acești anticorpi din invenție au bune proprietăți ADCC, care pot fi mărite, dacă se dorește, prin tehnici cunoscute în domeniu, timp de înjumătățire favorabil la administrare *in vivo* la om și există tehnologie de inginerie CH3 care poate furniza lanțuri grele modificate, care formează heterodimeri preferențial față de homodimeri la co-exprimare în celule clonale.

Un anticorp din invenție este de preferință un anticorp "în lungime completă". Termenul 'lungime completă' conform invenției definește un anticorp în esență complet, dar care nu are neapărat toate funcțiile unui anticorp intact. Pentru claritate, un anticorp în lungime completă conține două lanțuri grele și două lanțuri ușoare. Fiecare lanț conține regiuni constante (C) și variabile (V), care pot fi descompuse în domenii denumite CH1, CH2, CH3, VH pentru lanțul greu, și CL, VL pentru lanțul ușor. Un anticorp se leagă de antigen prin domeniile variabile conținute în porțiunea fragmentului Fab. Anticorpul poate interacționa cu molecule și celule ale sistemului imunitar prin domeniile constante, în mare parte prin porțiunea Fc.

Termenii 'domeniul variabil', 'pereche VH/VL', 'VH/VL' se utilizează în prezenta interschimbabil. Anticorpul în lungime completă conform invenției includ anticorpi în care pot fi prezente mutații care asigură caracteristici dorite sau reprezintă doar alternative ale celor din lanțul inițial. Aceste mutații nu ar trebui să fie deleții ale porțiunilor substanțiale ale oricăror regiuni. Totuși, anticorpul în care se șterg unul sau mai multe reziduuri aminoacidice, fără a modifica în esență caracteristicile de legare ale anticorpului rezultat, sunt incluși în termenul "anticorp în lungime completă". De exemplu, un anticorp IgG poate avea 1-20 de inserții, deleții de reziduuri aminoacidice sau o combinație a acestora în regiunea constantă. De exemplu, activitatea ADCC a unui anticorp poate fi îmbunătățită când anticorpul în sine are o activitate ADCC redusă, modificând ușor regiunea constantă a anticorpului (Junttila, T. T., K. et al. (2010). *Cancer Research* 70: 4481-4489). Se fac uneori modificări pentru a îmbunătăți depozitarea sau producția sau pentru a îndepărta lizinele C-terminale (Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N). O altă modalitate de îmbunătățire a activității ADCC a unui anticorp este prin perturbarea enzimatică a căii de glicozilare, ducând la fucoză redusă (von Horsten et al. (2010); *Glycobiology* 20:1607-1618). Există mai multe metode *in vitro* pentru determinarea eficienței anticorpilor sau celulelor efectoare în determinarea ADCC. Printre acestea se găsesc testele de eliberare a cromului-51 [⁵¹Cr], testele de eliberare a europiului [Eu] și testele de eliberare a

sulfului-35 [S35]. De obicei, o linie celulară țintă marcată care exprimă un anumit antigen expus la suprafață este incubată cu anticorpul specific pentru acel antigen. După spălare, celulele efectoare care exprimă receptorul Fc CD16 sunt co-incubate cu celulele țintă marcate cu anticorp. Liza celulelor țintă se măsoară apoi prin eliberarea marcatorului intracelular, de exemplu cu un contor de scintilații sau prin spectrofotometrie.

Un anticorp bispecific din invenție poate fi într-o aplicare afucozilat. Un anticorp bispecific din invenție cuprinde de preferință o cantitate redusă de fucozilare a structurii de carbohidrat N-linkate în regiunea Fc, în comparație cu același anticorp produs într-o celulă CHO normală.

Se preferă anticorpi IgG în lungime completă datorită timpului de înjumătățire favorabil și necesității de a fi cât mai aproape de moleculele (umane) complet autologe din motive de imunogenicitate. Un anticorp din invenție este de preferință un anticorp IgG bispecific, de preferință un anticorp IgG1 bispecific în lungime completă. IgG1 este favorizat datorită timpului de înjumătățire în circulație îndelungat la om. Pentru a preveni imunogenicitatea la om, se preferă ca anticorpul IgG bispecific conform invenției să fie IgG1 uman.

Termenul 'bispecific' (bs) înseamnă că o parte a anticorpului (definit mai sus) se leagă de un epitop de pe un antigen, iar o a doua parte se leagă de un epitop diferit pe același antigen sau un antigen diferit. Epitopii diferiți sunt prezenți în mod tipic pe antigene diferite. Epitopii diferiți pot fi însă prezenți și pe același antigen. Conform prezentei invenții, primul și al doilea antigen sunt două proteine diferite. Un anticorp bispecific preferat este un anticorp cuprinzând părți din cei doi anticorpi monoclonali diferiți și în consecință se pot lega de două tipuri diferite de antigen. În funcție de nivelul de expresie, localizarea (sub-)celulară și stoichiometria celor două antigene recunoscute de un anticorp bispecific, ambele brațe Fab ale anticorpului pot lega sau nu simultan epitopul lor. Un braț al anticorpului bispecific conține în mod tipic domeniul variabil al unui anticorp și celălalt braț conține domeniul variabil al unui alt anticorp (i.e. un braț al anticorpului bispecific este format dintr-un lanț greu împerecheat cu un lanț ușor, iar celălalt braț este format dintr-un lanț greu diferit împerecheat cu un lanț ușor). Regiunile variabile ale lanțului greu al anticorpului bispecific din invenție sunt în mod tipic diferite una de cealaltă, în timp ce regiunile variabile ale lanțului ușor sunt de preferință indentice în anticorpii bispecifici din invenție. Un anticorp bispecific în care regiunile variabile diferite ale lanțului greu sunt asociate cu același lanț ușor sau comun este denumit de asemenea anticorp bispecific cu un lanț ușor comun (cLC). Se prevede așadar și un anticorp bispecific conform invenției, unde ambele brațe cuprind un lanț ușor comun.

Anticorpul bispecific preferat se poate obține prin co-expresia a două lanțuri grele diferite și a unui lanț ușor comun într-o singură celulă. Când se folosesc domenii CH3 de tip sălbatic, co-expresia a două lanțuri grele diferite (A și B) și a unui lanț ușor comun va produce trei specii de anticorp diferite, AA, AB și BB. AA și BB sunt denumiri pentru cei doi anticorpi bivalenți, mono-specfici, și AB este o denumire pentru anticorpul bispecific. Pentru a crește procentajul produsului bispecific dorit (AB) se poate utiliza inginerie CH3 sau, cu alte cuvinte, se pot folosi lanțuri grele cu domenii de heterodimerizare compatibile, așa cum se definește mai jos.

Termenul 'domenii de heterodimerizare compatibile', în sensul folosit în prezenta, se referă la domenii proteice modificate astfel încât domeniul modificat A' va forma preferențial heterodimeri cu domeniul B' modificat și vice versa, reducând homodimerizarea între A'-A' și B'-B'.

Anticorpul bispecific descriși în prezenta cuprind de preferință un lanț ușor comun. Termenul 'lanț ușor comun' conform invenției se referă la lanțuri ușoare care pot fi identice sau pot avea unele diferențe ale secvenței de aminoacizi, fără ca specificitatea de legare a anticorpului în lungime completă să fie afectată. Este de exemplu posibil, conform definiției lanțurilor ușoare comune din prezenta, prepararea sau identificarea lanțurilor ușoare care nu sunt identice, dar sunt încă funcțional echivalente, de ex. prin introducerea și testarea modificărilor aminoacidice conservative, a modificărilor de aminoacizi în regiuni care nu contribuie sau contribuie doar parțial la specificitatea de legare la împerechere cu lanțul greu etc.. Termenii 'lanț ușor comun', 'VL comun', 'lanț ușor individual', 'VL individual', cu sau fără adăugarea termenului 'reordonat', se utilizează interschimbabil în prezenta. Un aspect al prezentei invenții constă din utilizarea ca lanț ușor comun a unui lanț ușor uman care se poate combina cu diferite lanțuri grele pentru a forma anticorpi cu domenii funcționale de legare a antigenului (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998 și Nissim et al. 1994). De preferință, lanțul ușor comun are o secvență din linia germinală. O secvență din linia germinală preferată este o regiune variabilă a lanțului ușor care se utilizează frecvent în repertoriul uman și are o bună stabilitate termodinamică, producție și solubilitate. Un lanț ușor din linia germinală preferat este 012, de preferință lanțul ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 (Figura 3) sau un fragment sau un echivalent funcțional (i.e. același segment genic IgVκ1-39, dar segment genic IGJκ diferit) al acestuia (nomenclatură conform bazei de date IMGT de la www.imgt.org). Același principiu se aplică însă și unui lanț ușor lambda și acesta este așadar de asemenea prevăzut în contextul invenției. Se prevede așadar și un anticorp bispecific conform invenției, unde lanțul ușor comun este un lanț ușor din

linia germinală, de preferință un lanț ușor kappa uman din linia germinală reordonat cuprinzând segmentul genic IgV κ 1-39, cel mai preferabil lanțul ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 (Figura 3). Termenii lanț ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01, IGKV1-39/IG κ J1, lanțul ușor huV κ 1-39 sau, pe scurt, huV κ 1-39, sau simplu 1-39 se utilizează interschimbabil în cadrul cererii. Evident, persoanele cu competențe în domeniu vor recunoaște că termenul "comun" se referă și la echivalenți funcționali ai lanțului ușor a căror secvență de aminoacizi nu este identică. Există mai multe variante ale lanțului ușor respectiv în care sunt prezente mutații (deleții, substituții, adăugări) care nu influențează semnificativ formarea regiunilor de legare funcționale. Lanțul ușor din prezenta invenție poate fi de asemenea un lanț ușor specificat mai sus, având 1-20, de preferință 1-5 inserții, deleții, substituții de aminoacizi sau o combinație a acestora.

Se au în vedere de asemenea anticorpi în care un VH poate recunoaște specific un prim antigen și VL, împerecheat cu VH într-un domeniu variabil imunoglobulinic, poate recunoaște specific un al doilea antigen. Perechea VH/VL rezultată va lega antigenul 1 sau antigenul 2. Acești așa numiți "anticorpi doi în unu", descriși de exemplu în WO 2008/027236, WO 2010/108127 și Schaefer et al (2011 Cancer Cell 20, 472-486), sunt diferiți de anticorpii bispecifici din invenție și sunt denumiți și anticorpi "doi în unu".

O parte a unui anticorp este o parte de legare a antigenului și în mod tipic conține domeniile variabile ale anticorpului. O parte poate fi de asemenea un așa numit fragment de anticorp cu un singur domeniu. Un fragment de anticorp cu un singur domeniu (sdAb, denumit Nanobody de dezvoltatorul Ablynx) este un fragment de anticorp cu un singur domeniu de anticorp variabil monomeric. La fel ca un anticorp întreg, se poate lega selectiv de un antigen specific. Cu o greutate moleculară de numai 12-15 kDa, fragmentele de anticorp cu un singur domeniu sunt mult mai mici decât anticorpii obișnuiți (150-160 kDa) alcătuiți din două lanțuri proteice grele și două lanțuri ușoare, și chiar mai mici decât fragmentele Fab (~50 kDa, un lanț ușor și jumătate dintr-un lanț greu) și fragmentele variabile monocatenare (~25 kDa, două domenii variabile, unul dintr-un lanț ușor și unul dintr-un lanț greu). Anticorpii cu un singur domeniu nu sunt în sine mult mai mici decât anticorpii normali (reprezentând în mod tipic 90-100kDa). Fragmentele de anticorp cu un singur domeniu sunt în mare parte modificate din anticorpii cu lanțuri grele care se găsesc în camelide; acestea sunt denumite fragmente VHH (Nanobodies®). Unii pești au de asemenea anticorpi numai cu lanțuri grele (IgNAR, 'receptor antigenic nou imunoglobulinic'), din care se pot obține fragmente de anticorp cu un singur domeniu denumite fragmente VNAR. O metodă alternativă este împărțirea domeniilor variabile dimerice din imunoglobulina G (IgG) obișnuită de la oameni sau șoareci în monomeri.

Deși cea mai mare parte a cercetării anticorpilor cu un singur domeniu se bazează în prezent pe domenii variabile din lanțul greu, s-a arătat că și nanocorpii proveniți din lanțuri ușoare se leagă specific de epitopii țintă. Un exemplu nelimitativ al unei părți de anticorp conține un domeniu variabil al unui lanț greu și/sau unui lanț ușor al unui anticorp sau unui echivalent al acestuia. Exemplele nelimitative de astfel de părți sunt VHH, anticorpi cu domenii umane (dAbs) și Unibodies. Părțile sau derivații de anticorp preferați au cel puțin un domeniu variabil al unui lanț greu și un lanț ușor al unui anticorp sau echivalenți. Exemplele nelimitative de astfel de molecule de legare sunt fragmente F(ab) și fragmente Fv monocatenare. O parte funcțională a unui anticorp bispecific cuprinde părțile de legare a antigenului ale anticorpului bispecific sau un derivat și/sau analog al părților de legare. După cum s-a menționat în prezenta mai sus, partea de legare a unui anticorp este inclusă în domeniul variabil.

Un derivat al unui anticorp este o proteină care, cu excepția regiunilor CDR, se abate de la secvența aminoacidică a unui anticorp natural în cel mult 20 de aminoacizi. Un derivat al unui anticorp divulgat în prezenta este un anticorp care se abate de la secvența aminoacidică respectivă în cel mult 20 de aminoacizi.

Membrul asociat cu membrana preferat al căii WNT de care se leagă o proteină din invenție este LRP5, LRP6, LGR4, LGR5, LGR6, FRZ1, FRZ2, FRZ3, FRZ4, FRZ5, FRZ6, FRZ7, FRZ8, FRZ9, FRZ10, ZNRF3, RNF43, N-Cadherin, Kremen1 și Kremen2, ROR2, RYK. Din această listă, se preferă membrii asociați cu membrana ai familiei LGR care sunt activi în calea WNT, în mod specific LGR4, LGR5 și LGR6. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al familiei LGR este LGR4 sau LGR 5, în mod specific LGR5. Alți membri asociați cu membrana preferați ai căii WNT canonice sunt ZNRF3 și RNF43.

S-a demonstrat că Lgr4, Lgr5 și Lgr6 de șoarece sunt receptori de mare afinitate pentru R-spondine (R-spondin 1-4) ducând la fosforilare mărită a receptorilor Wnt Lrp5/6 și stabilizarea b-cateninei fără implicarea semnalizării proteinei G (Carmon, K.S., et al. (2011). Proc Natl Acad Sci USA 108, 11452-11457; de Lau, W., et al. (2011) Nature 476, 293-297.). R-spondinele sunt membrii unei familii mult mai mari de proteine care se caracterizează prin prezența repetițiilor trombospondinice (TSR). R-spondinele conțin de asemenea repetiții Furin bogate în cisteină N-terminale care trebuie să exercite activitatea de mărire Wnt, măsurată prin stabilizarea b-cateninei și fosforilarea co-receptorului Wnt/Frizzled Lrp6 (Kim et al. (2005)). Au fost raportate fuziuni genice care cresc nivelurile de expresie ale R-spondinelor funcționale într-un subset de cancere de colon umane (Seshagiri, S., et al. (2012). Nature 488, 660-664.). Deși rolul perceput al complexului Lgr-R-spondin este modularea semnalizării prin complexul de receptori Lrp-Frizzled-wnt, modelele actuale sugerează că acest complex Lgr-R-spondin este

în sine supus modulării prin ligazele E3 foarte omoloage Rnf43 și Znf3. În mod specific, receptorii Lgr4, Lgr5 și Lgr6 ajută la recrutarea eficientă a liganzilor R-spondin și aducerea acestora în poziție pentru interacțiune cu Rnf43/Znf3, conținând și situsuri de legare R-spondin (de Lau, W., et al (2014). *Genes Dev* 28, 305-316). Această interacțiune duce la clearance membranar al Rnf43 sau Znf3, având ca rezultat persistența receptorilor Frizzled de suprafață și amplificarea intensității semnalului wnt (de Lau, et al (2014). *Genes Dev* 28, 305-316), îmbogățit în cancerul de colon (Hao, H.-X., et al. (2012) *Nature* 485, 195-200).

Un membru asociat cu membrana al căii WNT care este activ în calea canonică poate fi de asemenea activ, în funcție de membrul specific, în calea necanonică și vice versa.

Familia receptorilor (HER) pentru factorul de creștere epidermic uman (EGF) are patru membri: ErbB (eritroblastom)-1, ErbB-2, ErbB-3 și ErbB-4. Receptorul (EGFR, ErbB1 sau HER1) pentru factorul de creștere epidermic (EGF) este un membru al unei familii de patru tirozin kinaze receptoare (RTK), denumite Her- sau cErbB-1, -2, -3 și -4. ErbB-1 este cunoscut și sub diferite alte sinonime, cea mai obișnuită fiind EGFR. EGFR are un domeniu extracelular (ECD) alcătuit din patru sub-domenii, dintre care două sunt implicate în legarea ligandului și două sunt implicate în homodimerizare și heterodimerizare. EGFR integrează semnale extracelulare de la o varietate de liganzi pentru a produce diverse răspunsuri intracelulare. Calea majoră de transducție a semnalelor activată de EGFR este alcătuită din cascada de semnalizare mitogenică a protein kinazei activate de mitogenul Ras (MAPK). Activarea acestei căi este inițiată de recrutarea Grb2 în EGFR tirozin fosforilată. Aceasta duce la activarea Ras prin factorul de schimb nucleotidic Ras-guanina legat de Grb2 Son of Sevenless (SOS). În plus, calea de transducție a semnalului PI3-kinaza-Akt este de asemenea activată de EGFR, cu toate că această activare este mult mai puternică în cazul în care există co-expresie ErbB-3 (HER3). EGFR este implicat în mai multe malignități epiteliale umane, în special cancere mamare, vezicale, cancer pulmonar macrocelular, de colon, ovarian, la cap și gât și creier. S-au descoperit mutații de activare în genă, precum și supraexpresia receptorului și a liganzilor săi, ducând la bucle de activare autocrine. Această RTK s-a folosit așadar amplu ca țintă pentru terapia anti-cancer. S-au dezvoltat atât inhibitori molecule mici care țințesc RTK, cât și anticorpi monoclonali (mAb) direcționați către domeniile extracelulare de legare a ligandului, care au dovedit până acum câteva succese clinice, deși în cea mai mare parte pentru un grup select de pacienți. Numărul de referință din baza de date pentru proteina umană EGFR și gena care o codifică este (GenBank NM_005228.3). Acest număr de referință este dat în primul rând pentru a asigura o altă metodă de identificare a proteinei EGFR ca țintă, secvența efectivă a

proteinei EGFR legate de un anticorp poate varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena de codificare precum cele care apar în unele cancere etc.. Se folosesc în prezenta termenii cancer și tumoare și, în mod tipic, ambii se referă la cancer, dacă nu se indică altceva în mod specific.

Acolo unde se menționează în prezenta EGFR, acesta se referă la EGFR, dacă nu se indică altceva. Situsul de legare a antigenului care leagă EGFR leagă EGFR și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate pe unele tumori pozitive EGFR.

Termenul 'ErbB-3' în sensul folosit în prezenta se referă la proteina care, la om, este codificată de gena ERBB3. Denumiri alternative pentru genă sau proteină sunt HER3; LCCS2; MDA-BF-1; c-ErbB-3; c-ErbB3; ErbB3-S; p180-ErbB3; p45-sErbB3; și p85-sErbB3. Acolo unde se face referire în prezenta la ErbB-3, se face referire la ErbB-3 uman. Un anticorp cuprinzând un situs de legare a antigenului care leagă ErbB-3 leagă ErbB-3 uman. Situsul de legare a antigenului ErbB-3 poate lega de asemenea, datorită asemănării secvențelor și structurilor terțiare între ortologi umani și de alte mamifere, un astfel de ortolog, dar nu neapărat. Numerele de referință din baza de date pentru proteina ErbB-3 umană și gena care o codifică sunt (NP_001005915.1, NP_001973.2, NC_000012.11, NC_018923.2, NT_029419.12). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a ErbB-3 ca o țintă, secvența proteinei ErbB-3 legate de un anticorp putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului ErbB-3 leagă ErbB-3 și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru ErbB-3. Situsul de legare a antigenului care leagă ErbB-3 leagă de preferință domeniul III al ErbB-3. Membrul familiei de receptori EGF, menționat în prezenta ca o țintă pentru proteina din invenție sau anticorpul bispecific din invenție, este de preferință receptorul factorului de creștere epidermic Erbb-1 (EGFR), ErbB-3 sau ErbB-4. Într-o aplicare preferată, membrul familiei receptorilor EGF este ErbB-1 sau ErbB-3.

Termenul "LGR" se referă la familia de proteine cunoscute ca receptori cuplați cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină. Se cunosc mai mulți membri ai familiei implicați în calea de semnalizare WNT, în mod remarcabil LGR4; LGR5 și LGR6.

LGR4 este receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 4. Denumiri alternative pentru genă sau proteină sunt: GPR48; receptorul cuplat cu proteina G 48; BNMD17; receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 4; receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 4; receptorul cuplat cu proteina G 48;

O proteină sau un anticorp din invenție care leagă LGR4 leagă LGR4 uman. Proteina sau anticorpul din invenție care leagă LGR4 poate lega de asemenea, datorită asemănării secvențelor și structurilor terțiare între ortologi umani și de alte mamifere, un astfel de ortolog, dar nu neapărat. Numerele de referință din baza de date pentru proteina LGR4 umană și gena care o codifică sunt (NC_000011.10; NC_018922.2; NT_009237.19; NP_060960.2). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a LGR4 ca o țintă, secvența proteinei LGR4 legate putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului LGR4 leagă LGR4 și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru LGR4.

LGR5 este receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 5. Denumiri alternative pentru genă sau proteină sunt receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 5; receptorul cuplat cu proteina G conținând repetiții bogate în leucină 5; receptorul cuplat cu proteina G HG38; receptorul cuplat cu proteina G 49; receptorul cuplat cu proteina G 67; GPR67; GPR49; receptorul orfan cuplat cu proteina G HG38; receptorul cuplat cu proteina G 49; GPR49; HG38 și FEX.

O proteină sau un anticorp din invenție care leagă LGR5 leagă LGR5 uman. Proteina sau anticorpul din invenție care leagă LGR5 poate lega de asemenea, datorită asemănării secvențelor și structurilor terțiare între ortologi umani și de alte mamifere, un astfel de ortolog, dar nu neapărat. Numerele de referință din baza de date pentru proteina LGR5 umană și gena care o codifică sunt (NC_000012.12; NT_029419.13; NC_018923.2; NP_001264155.1; NP_001264156.1; NP_003658.1). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a LGR5 ca o țintă, secvența proteinei LGR5 legate putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului LGR5 leagă LGR5 și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru LGR5.

ZNRF3 este deget de zinc și inelar 3. Denumiri alternative pentru genă sau proteină sunt deget de zinc și inelar 3; proteină deget de zinc/INELAR 3; proteina deget INELAR 203; KIAA1133; RNF203; deget de zinc tip C3HC4 nou (deget inelar); E3 ubiquitin-protein ligaza ZNRF3; CTA-292E10.6; EC 6.3.2.; și BK747E2.3 3.

O proteină sau un anticorp din invenție care leagă ZNRF3 leagă ZNRF3 uman. Proteina sau anticorpul din invenție care leagă ZNRF3 poate lega de asemenea, datorită asemănării secvențelor și structurilor terțiare între ortologi umani și de alte mamifere, un astfel de ortolog,

dar nu neapărat. Numerele de referință din baza de date pentru proteina ZNRF3 umană și gena care o codifică sunt (NC_000022.11; NT_011520.13; NC_018933.2; NP_001193927.1; NP_115549.2). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a ZNRF3 ca o țintă, secvența proteinei ZNRF3 legate putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului ZNRF3 leagă ZNRF3 și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru ZNRF3.

RNF43 este proteina deget inelar 43. Denumiri alternative pentru genă sau proteină sunt proteina deget inelar 43; RNF124; E3 ubiquitin-protein ligaza RNF43; proteina deget INELAR 43; EC 6.3.2.; URCC.

O proteină sau un anticorp din invenție care leagă RNF43 leagă RNF43 uman. Proteina sau anticorpul din invenție care leagă RNF43 poate lega de asemenea, datorită asemănării secvențelor și structurilor terțiare între ortologi umani și de alte mamifere, un astfel de ortolog, dar nu neapărat. Numerele de referință din baza de date pentru proteina RNF43 umană și gena care o codifică sunt (NC_000017.11; NT_010783.16; NC_018928.2; NP_001292473.1; NP_001292474.1; NP_060233.3). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a RNF43 ca o țintă, secvența proteinei RNF43 legate putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului RNF43 leagă RNF43 și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru RNF43.

Receptorul factorului de creștere de tip insulenic 1 (IGF-1) leagă factorul de creștere de tip insulenic cu afinitate mare. Receptorul are activitate de tirozin kinază. Receptorul factorului de creștere de tip insulenic I are un rol esențial în evenimente de transformare. Clivarea precursorului generează subunități alpha și beta. Este supraexprimat în majoritatea țesuturilor maligne unde funcționează ca un agent anti-apoptotic prin mărirea supraviețuirii celulare. Proteina este cunoscută sub mai multe nume diferite cum ar fi receptorul IGF-I; EC 2.7.10.1; receptorul factorului de creștere de tip insulenic I; IGF1R solubil; varianta 1; IGF1R solubil varianta 2; antigen CD221; EC 2.7.10; CD221; IGFIR; JTK13; și IGFR. ID externe pentru IGFIR sunt HGNC: 5465; Entrez Gene: 3480; Ensembl: ENSG00000140443; OMIM: 147370 și UniprotKB: P08069.

Invenția prevede de asemenea o metodă de inhibare a creșterii unei celule care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT într-un sistem care permite creșterea celulei, metoda cuprinzând prevederea sistemului cu o proteină din invenție

sau un anticorp bispecific din invenție. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Sistemul este de preferință un sistem de cultură. Metoda cuprinde de preferință cultivarea celulei respective în sistem.

În contextul prezentei invenții, se spune că celula exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT dacă acea celulă cuprinde ARN detectabil care codifică membrul asociat cu membrana al căii WNT. Expresia poate fi detectată de asemenea prin incubarea celulei cu un anticorp care se leagă de membrul asociat cu membrana al căii WNT. Totuși, unii membri nu sunt exprimați la un nivel suficient de mare pentru un astfel de test cu anticorpi sau, pentru unii membri, nu există anticorpi specifici. În aceste cazuri se preferă detecția mARN.

Acolo unde se dau în prezenta numere de referință sau denumiri alternative ale proteinelor/genelor, se dau în primul rând pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a proteinei menționate ca o țintă, secvența proteinei țintă legate de un anticorp din invenție putând varia, de exemplu din cauza unei mutații și/sau a unei matisări alternative în gena codificatoare, cum ar fi cele care apar în unele cancere etc..

Invenția prevede de asemenea o metodă de tratare a unui individ având un cancer, metoda cuprinzând administrarea unei proteine din invenție sau a unui anticorp bispecific din invenție la individ. Individul este de preferință un individ care are cancer. Cancerul este de preferință un adenocarcinom. Cancerele preferate sunt cancer colorectal; cancer pancreatic; cancer pulmonar; cancer mamar; cancer hepatic; cancer de prostată; cancer ovarian; cancer de col uterin; cancer endometrial; cancer la cap și gât; melanom; cancer testicular; cancer urotelial; cancer renal; cancer stomacal; sau cancer carcinoid. Într-o aplicare preferată cancerul este cancer colorectal; cancer pancreatic; cancer pulmonar; cancer mamar; cancer hepatic; cancer de prostată; cancer ovarian; cancer de col uterin; cancer endometrial; cancer la cap și gât; sau melanom. Într-o aplicare preferată în mod special, cancerul este cancer colorectal; cancer pancreatic; cancer pulmonar; cancer mamar; sau cancer hepatic. Într-o aplicare preferată în mod special, cancerul este un cancer gastrointestinal. Într-o aplicare preferată, cancerul este cancer colorectal.

Cancerul este de preferință, dar nelimitativ, un cancer care prezintă un răspuns de creștere la prezentarea unui ligand al unui membru al familiei receptorilor EGF. Proteina din invenție este de preferință o proteină care se leagă de un membru al familiei receptorilor EGF pentru care cancerul prezintă un răspuns de creștere. Într-o aplicare preferată, cancerul prezintă un răspuns de creștere *in vitro* în răspuns la membrii familiei EGF în mediul de cultură. *In vitro* este de preferință o cultură precum cea detaliată pentru organoizi în secțiunea

experimentală. Cancerul este de preferință un cancer care exprimă membrul asociat cu membrana al căii WNT de care se leagă proteina din invenție.

Se prevede de asemenea un sistem celular cuprinzând o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție și o celulă care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Sistemul sau sistemul celular descris în prezenta este de preferință un sistem de cultură *in vitro*. Sistemul poate fi folosit pentru a detecta răspunsuri de creștere ale celulei. Într-o aplicare preferată, ligandul receptorului EGF este un ligand pentru un membru preferat al familiei receptorilor EGF definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al căii WNT este un membru preferat asociat cu membrana al căii WNT definit în altă parte în prezenta.

Un cancer sau o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF prezintă un răspuns de creștere (proliferare) la un ligand al receptorului EGF. O metodă preferată de determinare dacă o celulă sau un cancer răspunde la ligandul receptorului EGF este determinarea răspunsului la factorul de creștere al celulei într-un test de cultură organoidă descris în exemple. O metodă este însămânțarea celulei sau celulelor canceroase în sistemul celular organoid în prezența sau absența factorilor de creștere precum EGF (5ng/ml) sau NRG (5ng/ml) și cultivare timp de 5 zile. Numărul celulelor viabile poate fi determinat apoi folosind testul de viabilitate celulară Cell Titer Glo (Promega, cat. nr. G7571). Citirea luminescenței folosind celule stimulate cu factor de creștere poate fi comparată apoi cu cea obținută folosind celule nestimulate (absența factorului(ilor) de creștere).

Invenția prevede de asemenea o metodă de inhibare a creșterii unei celule care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT într-un sistem care permite creșterea celulei, metoda cuprinzând prevederea sistemului cu o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului EGF care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Inhibarea înseamnă de preferință o scădere de cel puțin 10% a numărului de celule sau a unei măsuri a numărului de celule, cum ar fi dimensiunea tumorală, în comparație cu numărul de celule rezultat în condiții altfel similare, cu excepția prezenței proteinei sau anticorpului bispecific din invenție. Inhibarea înseamnă de preferință o scădere de cel puțin 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% a numărului de celule. Inhibarea poate fi de asemenea o scădere de cel puțin 10% a altor

parametri asociați cu malignitate tumorală sau displazie, cum ar fi numărul de lumene per organoid, în comparație cu numărul de lumene rezultat în condiții altfel similare, cu excepția prezenței proteinei sau anticorpului bispecific din invenție. Inhibarea înseamnă de preferință o scădere de cel puțin 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% a numărului de lumene per organoid.

Pentru claritate, referirea la creșterea unei celule în sensul folosit în prezenta se referă la o modificare a numărului de celule. Inhibarea creșterii se referă la o scădere a numărului de celule care s-ar obține în caz contrar. Mărirea creșterii se referă la o mărire a numărului de celule care s-ar obține în caz contrar. Creșterea unei celule se referă în mod tipic la proliferarea celulei.

Legarea proteinei sau anticorpului bispecific din invenție de o celulă cuprinzând membrul respectiv asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) sau cMET; și/sau membrul asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT pe membrană reduce creșterea/proliferarea acelei celule în prezența unui factor de creștere pentru familia receptorilor factorului de creștere epidermic (EGF) sau cMET și/sau Rspodin. Reducerea se compară cu creșterea/proliferarea acelei celule în condiții altfel identice în absența proteinei sau anticorpului bispecific din invenție.

Proteina sau anticorpul bispecific din invenție, sau o parte funcțională, un derivat și/sau analog, se selectează de preferință dintre o proteină sau un anticorp bispecific din invenție, sau o parte funcțională, un derivat și/sau analog al acestuia, care leagă ErbB-1 și LGR4; ErbB-1 și LGR5; ErbB-1 și LGR6; ErbB-1 și ZNRF3; ErbB-1 și RNF43; ErbB-2 și LGR4; ErbB-2 și LGR5; ErbB-2 și LGR6; ErbB-2 și ZNRF3; ErbB-2 și RNF43; ErbB-3 și LGR4; ErbB-3 și LGR5; ErbB-3 și LGR6; ErbB-3 și ZNRF3; ErbB-3 și RNF43; ErbB-4 și LGR4; ErbB-4 și LGR5; ErbB-4 și LGR6; ErbB-4 și ZNRF3; și ErbB-4 și RNF43.

Într-o aplicare preferată, se selectează dintre ErbB-1 și LGR4; ErbB-1 și LGR5; ErbB-1 și ZNRF3; ErbB-1 și RNF43; ErbB-3 și LGR4; ErbB-3 și LGR5; ErbB-3 și ZNRF3; ErbB-3 și RNF43; ErbB-4 și LGR4; ErbB-4 și LGR5; ErbB-4 și ZNRF3; și ErbB-4 și RNF43. Într-o aplicare preferată, se selectează dintre ErbB-1 și LGR4; ErbB-1 și LGR5; ErbB-1 și ZNRF3; ErbB-1 și RNF43; ErbB-3 și LGR4; ErbB-3 și LGR5; ErbB-3 și ZNRF3; ErbB-3 și RNF43. De preferință, se selectează dintre ErbB-1 și LGR5; ErbB-1 și ZNRF3; ErbB-1 și RNF43; ErbB-3 și LGR5; ErbB-3 și ZNRF3; și ErbB-3 și RNF43. Într-o aplicare preferată în mod special, proteina sau anticorpul bispecific din invenție, sau o parte funcțională, un derivat și/sau analog, se selectează dintre o proteină sau un anticorp bispecific din invenție, sau o parte

funcțională, un derivat și/sau analog al acestuia, care leagă ErbB-1 și LGR5; și ErbB-3 și LGR5.

Anticorpul sau anticorpul bispecific cuprinde de preferință două domenii variabile, unde un domeniu variabil leagă o parte extracelulară a unei proteine și celălalt domeniu variabil leagă o parte extracelulară a celeilalte proteine.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă ErbB-1, unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-1 selectată din grupul constând din MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicată în figura 1, sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unui VH selectată din grupul constând din MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicată în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicată în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-1 selectate din grupul constând din MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid din secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-1 selectate din grupul constând din MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicate în figura 1. O regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF3755. O altă regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF4280.

S-a arătat că anticorpii cuprinzând unul sau mai multe domenii variabile cu o regiune variabilă a lanțului greu MF3755 au o mai bună eficiență când se utilizează pentru a inhiba creșterea unui cancer sau a unei celule care răspunde la ligand EGFR. În contextul anticorpilor bispecifici, un braț al anticorpului cuprinzând un domeniu variabil cu o regiune variabilă a lanțului greu MF3755 se combină mai bine cu o varietate de alte brațe cuprinzând domenii variabile care leagă părți extracelulare ale altor proteine de suprafață celulară. Anticorpii cuprinzând un domeniu variabil cu regiunea variabilă a lanțului greu MF4280 funcționează bine și cu un domeniu variabil care leagă LGR4, LGR5, LGR6, ZNRF3 sau RNF43.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă ErbB-3, unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-3 selectată din grupul constând din MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicate în figura 1, sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unui VH selectat din grupul constând din MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, așa cum se indică în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicată în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-3 selectate din grupul constând din MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid de secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru ErbB-3 selectate din grupul constând din MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicate în figura 1. O regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF3178.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă LGR4, unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru LGR4 selectată din grupul constând din MF5777; sau MF5781, indicată în figura 1, sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unui VH selectat din grupul constând din MF5777; sau MF5781, așa cum se indică în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF5777; sau MF5781, indicată în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru LGR4 selectate din grupul constând din MF5777; sau MF5781, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în

cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid de secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru LGR4 selectate din grupul constând din MF5777; sau MF5781, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF5777; sau MF5781, indicate în figura 1. O regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF5781.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă LGR5, unde o regiune variabilă a lanțului greu al anticorpului bispecific respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru LGR5 selectată din grupul constând din MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1, sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil cuprinde o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unui VH selectată din grupul constând din MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, așa cum se indică în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF5790; MF5803; MF 5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru LGR5 selectate din grupul constând din MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid de secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru LGR5 selectate din grupul constând din MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1. Regiunile variabile preferate ale lanțului greu sunt MF5790; MF5803; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818. Regiunile variabile preferate în mod special ale lanțului greu sunt MF5790; MF5814; MF5816; și MF5818; de preferință MF5814, MF5818 și MF5816, fiind preferată în special regiunea variabilă a lanțului greu MF5816. O altă regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF5818.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă RNF43, unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru RNF43 selectate din grupul constând din MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1 sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unei VH selectate din grupul constând din MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru RNF43 selectate din grupul constând din MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid de secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru RNF43 selectate din grupul constând din MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1. Lanțurile grele preferate sunt MF5832; sau MF5836. O regiune variabilă preferată a lanțului greu este MF5836.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde cel puțin secvența CDR3 a unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ZNRF3 selectate din grupul constând din MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1, sau unde o regiune variabilă a lanțului greu al domeniului variabil respectiv cuprinde o secvență CDR3 a lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în nu mai mult de un aminoacid de o secvență CDR3 a unei VH selectate din grupul constând din MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvența CDR3 a MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1.

Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale unei regiuni variabile a lanțului greu specifice pentru ZNRF3 selectate din grupul constând din MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1, sau secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale lanțului greu care diferă în cel mult trei, de preferință în cel mult doi, de preferință în cel mult un aminoacid de secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu specifice pentru ZNRF3 selectate din grupul constând din MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1. Domeniul variabil cuprinde de preferință o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând cel puțin secvențele CDR1, CDR2 și CDR3 ale MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1. Regiunile variabile preferate ale lanțului greu sunt MF5850; MF5853; MF5855; MF5884; sau MF5888. Regiunile variabile preferate ale lanțului greu sunt MF5888 și MF5850, de preferință MF5850.

Secvențele CDR variază de exemplu în scop de optimizare, de preferință pentru a îmbunătăți intensitatea legării sau stabilitatea anticorpului. Optimizarea se efectuează de preferință prin proceduri de mutageneză, după care se testează de preferință stabilitatea și/sau afinitatea de legare a anticorpilor rezultați și se selectează de preferință o secvență CDR specifică pentru EGFR sau ErbB 3 îmbunătățită. Persoanele cu competențe în domeniu pot genera variante de anticorp cuprinzând cel puțin o secvență CDR modificată conform invenției. De exemplu, se poate aplica substituție de aminoacizi conservativă. Exemplele de substituție aminoacidică conservativă includ substituția cu un reziduu hidrofob cum ar fi izoleucină, valină, leucină sau metionină, a unui alt reziduu hidrofob, și substituția cu un reziduu polar a unui alt reziduu polar, cum ar fi substituția cu arginină a lizinei, cu acid glutamic a acidului aspartic sau cu glutamină a asparaginei.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF3370; MF3755; MF4280 sau MF4289, indicat în figura 1, având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde de preferință secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755. Într-o aplicare preferată,

acest anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă un membru asociat cu membrana al căii WNT definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al căii WNT este LGR4, LGR5, RNF43 sau ZNRF3.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF3125; MF3176; MF3178; sau MF4863 indicate în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Un lanț greu preferat este MF3178. Într-o aplicare preferată, acest anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă un membru asociat cu membrana al căii WNT definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al căii WNT este LGR4, LGR5, RNF43 sau ZNRF3.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă LGR4 cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777; sau MF5781, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777; sau MF5781 indicate în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Într-o aplicare preferată, acest anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a membrului asociat cu membrana al familiei EGFR definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al familiei EGFR este EGFR sau HER3, de preferință EGFR. Un lanț greu preferat este MF3755.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă LGR5 cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790; MF5803; MF5805; MF5808; MF5809; MF5814; MF5816; MF5817; sau MF5818 indicate în figura 1, având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Într-o aplicare preferată, acest anticorp bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a membrului asociat cu membrana al familiei EGFR definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată membrul

asociat cu membrana al familiei EGFR este EGFR sau HER3, de preferință EGFR. Un lanț greu preferat este MF3755.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă RNF43 cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832; MF5836; sau MF5839, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832; MF5836; sau MF5839 indicate în figura 1, având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Într-o aplicare preferată, anticorpul bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a membrului asociat cu membrana al familiei EGFR definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată, membrul asociat cu membrana al familiei EGFR este EGFR sau HER3, de preferință EGFR. Un lanț greu preferat este MF3755.

Anticorpul bispecific din invenție cuprinzând un domeniu variabil care leagă ZNRF3 cuprinde de preferință lanțul VH al domeniului variabil respectiv și cuprinde secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888, indicate în figura 1; sau secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850; MF5853; MF5855; MF5862; MF5882; MF5884; MF5887; sau MF5888 indicate în figura 1, având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de secvența lanțului VH din Figura 1. Într-o aplicare preferată, anticorpul bispecific cuprinde un domeniu variabil care leagă o parte extracelulară a membrului asociat cu membrana al familiei EGFR definit în altă parte în prezenta. Într-o aplicare preferată membrul asociat cu membrana al familiei EGFR este EGFR sau HER3, de preferință EGFR. Un lanț greu preferat este MF3755.

De preferință, inserțiile, delețiile și substituțiile aminoacidice menționate într-un VH sau VL specificat în prezenta nu sunt prezente în regiunea CDR3. Inserțiile, delețiile și substituțiile aminoacidice menționate nu sunt de preferință prezente nici în regiunile CDR1 și CDR2. Inserțiile, delețiile și substituțiile aminoacidice menționate nu sunt de preferință prezente nici în regiunea FR4.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR4 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777, indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR4 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5

inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1 având cel mult 15,

de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă RNF43, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă RNF43 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă RNF43, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă RNF43 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un

domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5

inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă EGFR și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă EGFR cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR4 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR4 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1 având cel mult 15,

de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă LGR5 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă RNF43, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă RNF43 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5

inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care leagă HER3 și un domeniu variabil care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă HER3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1; sau

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3178 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH; și

unde lanțul VH al domeniului variabil care leagă ZNRF3 cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

O proteină sau un anticorp bispecific din prezenta invenție se utilizează de preferință la om. În acest scop, un anticorp din invenție este de preferință un anticorp uman sau umanizat. Toleranța unui om la o polipeptidă este determinată de multe aspecte diferite. Imunitatea, fie ea mediată de celule T, de celule B sau altele, este una dintre variabilele incluse în toleranța omului pentru o polipeptidă. Regiunea constantă a unui anticorp bispecific din prezenta invenție este de preferință o regiune constantă umană (Figura 4). Regiunea constantă poate conține una sau mai multe, de preferință nu mai mult de 10, de preferință nu mai mult de 5 diferențe aminoacidice față de regiunea constantă a unui anticorp uman natural. Se preferă ca partea constantă să provină în întregime dintr-un anticorp uman natural. Diferiți anticorpi produși în prezenta provin din șoareci cu lanț ușor comun imunizați cu ținta respectivă, așa cum se descrie în WO2009/157771. Diferiți anticorpi produși în prezenta provin dintr-o bibliotecă de domenii variabile ale anticorpilor umani. Prin urmare, aceste domenii variabile sunt umane. Regiunile CDR unice pot fi obținute de la om, pot fi sintetice sau pot proveni dintr-un alt organism. Regiunea variabilă este considerată o regiune variabilă umană când are o secvență de aminoacizi identică cu o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a unui anticorp uman natural, cu excepția regiunilor CDR. Regiunea variabilă a unui VH de anticorp care leagă un membru al familiei EGFR sau un membru asociat cu membrana al căii WNT, sau un lanț ușor într-un anticorp din invenție poate conține una sau mai multe, de preferință nu mai mult de 10, de preferință nu mai mult de 5 diferențe de aminoacizi față de regiunea variabilă a unui anticorp uman natural, fără a ține cont de posibilele diferențe în secvența aminoacidică a regiunilor CDR. Aceste mutații apar de asemenea în natură în contextul hiper mutației somatice.

Anticorpii pot proveni de la diferite specii de animale, cel puțin cu privire la regiunea variabilă a lanțului greu. Este uzuală umanizarea acestor regiuni variabile ale lanțului greu, de

ex. murine. Există diferite modalități în care se poate realiza acest lucru, printre care se află grefarea CDR într-o regiune variabilă a lanțului greu uman cu o structură 3D conformă cu structura 3D a regiunii variabile a lanțului greu murin; dezimunizarea regiunii variabile a lanțului greu murin, de preferință prin îndepărtarea epitopilor T sau B celulari cunoscuți sau suspectați din regiunea variabilă a lanțului greu murin. Îndepărtarea se realizează în mod tipic prin substituția unui sau mai multora dintre aminoacizii din epitop cu un alt aminoacid (în mod tipic conservativ), astfel încât secvența epitopului este modificată pentru a nu mai fi un epitop T sau B celular.

Regiunile variabile dezimunizate ale lanțului greu murin sunt mai puțin imunogenice la om decât regiunea variabilă originală a lanțului greu murin. De preferință, o regiune variabilă sau un domeniu din invenție este umanizat, de exemplu înlocuit. Folosind tehnici de înlocuire, reziduurile exterioare care sunt întâlnite rapid de sistemul imunitar sunt înlocuite selectiv cu reziduuri umane, formând o moleculă hibrid care cuprinde o suprafață slab imunogenică sau în mare măsură neimunogenică. Un animal utilizat în invenție este de preferință un mamifer, mai preferabil o primată, cel mai preferabil un om.

O proteină sau un anticorp bispecific conform invenției cuprinde de preferință o regiune constantă a unui anticorp uman. În funcție de diferențele din domeniile constante ale lanțurilor grele, anticorpul sunt grupați în cinci clase sau izotipuri: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE. Aceste clase sau izotipuri cuprind cel puțin unul din lanțurile grele care este denumit cu o literă grecească adecvată. Într-o aplicare preferată, invenția prevede un anticorp conform invenției, unde regiunea constantă este selectată din grupul regiunilor constante IgG, IgA, IgM, IgD și IgE, mai preferabil regiunea constantă cuprinde o regiune constantă IgG, mai preferabil o regiune constantă IgG1 (Figura 4), de preferință o regiune constantă IgG1 cu mutații. Are loc în natură o variație a regiunii constante a IgG1 și/sau este permisă fără modificarea proprietăților imunologice ale anticorpului rezultat. În mod tipic sunt permise între circa 1-10 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora în regiunea constantă.

Metodele raționale au evoluat către minimizarea conținutului reziduurilor non-umane în contextul uman. Există diferite metode de grefare cu succes a proprietății de legare a antigenului a unui anticorp pe un alt anticorp. Proprietățile de legare ale anticorpilor se găsesc predominant în secvența exactă a regiunii CDR3, susținută adesea de secvența regiunilor CDR1 și CDR2 în domeniul variabil combinat cu structura corespunzătoare a domeniului variabil ca un întreg. Există în prezent diferite metode de grefare a regiunilor CDR pe un domeniu variabil adecvat al unui alt anticorp. Unele din aceste metode sunt analizate în J.C. Almagro1 & J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, inclusă în prezenta prin referință.

Aceste cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință 1, 2, 3, 4 sau 5 substituții aminoacidice sunt de preferință substituții aminoacidice conservative, iar inserțiile, delețiile, substituțiile sau o combinație a acestora nu sunt de preferință în regiunea CDR3 a lanțului VH, de preferință nu în regiunea CDR1, CDR2 sau CDR3 a lanțului VH și de preferință nu în regiunea FR4.

Lanțul ușor al unui domeniu variabil cuprinzând o secvență a lanțului greu variabil, indicată în figura 3, este de preferință un lanț ușor din linia germinală din sau bazat pe 012, de preferință lanțul ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 sau un fragment sau un derivat funcțional al acestuia (nomenclatură conform bazei de date IMGT de la www.imgt.org). Se folosesc termenii lanțul ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgVκ1-39*01/IGJκ1*01, IGKV1-39/IGKJ1, lanțul ușor huVκ1-39 sau pe scurt huVκ1-39. Lanțul ușor poate avea 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora. Cele 1, 2, 3, 4 sau 5 substituții aminoacidice menționate sunt de preferință substituții aminoacidice conservative și inserțiile, delețiile, substituțiile sau combinația acestora nu sunt de preferință în regiunea CDR3 a lanțului VL, de preferință nu în regiunea CDR1, CDR2 sau CDR3 sau în regiunea FR4 a lanțului VL.

Există diferite metode de producere a anticorpilor bispecfici. O metodă presupune expresia a două lanțuri grele diferite și două lanțuri ușoare diferite într-o celulă și colectarea anticorpului produs de celulă. Anticorpul astfel produs va conține în mod tipic un grup de anticorpi cu combinații diferite de lanțuri grele și ușoare, unii dintre aceștia fiind anticorpul bispecific dorit. Anticorpul bispecific poate fi apoi purificat din grup. Raportul dintre anticorpul bispecific și alți anticorpi produși de celulă poate fi crescut în diferite moduri. Într-o aplicare preferată a invenției, raportul este crescut prin expresia nu a două lanțuri ușoare diferite, ci a două lanțuri ușoare în esență identice în celulă. Acest concept este denumit în domeniu și metoda "lanțului ușor comun". Când lanțurile ușoare în esență identice acționează împreună cu cele două lanțuri grele diferite, permițând formarea domeniilor variabile cu diferite situsuri de legare a antigenului și proprietăți de legare diferite concomitente, raportul anticorpului specific la un alt anticorp produs de celulă este îmbunătățit semnificativ față de expresia a două lanțuri ușoare diferite. Raportul anticorpului specific produs de celulă poate fi și mai mult îmbunătățit prin stimularea împerecherii a două lanțuri grele diferite față de împerecherea a două lanțuri grele identice. Se descriu în domeniu diferite modalități în care se poate realiza această heterodimerizare a lanțurilor grele. O modalitate este generarea anticorpilor bispecfici 'knob into hole'. Vezi cererea de brevet US 20030078385 (Arathoon et al. - Genentech). O altă metodă este folosirea modificării sarcinilor descrisă în Gunasekaran

(JBC 2010, vol 285, pp 19637-19646). O altă metodă, preferată, este descrisă în cererea provizorie US 61/635,935, urmată de cererea permanentă US nr. 13/866,747 și cererea PCT nr. PCT/NL2013/050294 (WO 2013/157954 A1). Se descriu metode și mijloace de producere a anticorpilor bispecfici (dintr-o celulă individuală), unde se prevăd mijloace care favorizează formarea anticorpilor bispecfici față de formarea anticorpilor monospecfici. Aceste metode se pot folosi de asemenea în mod avantajos în prezenta invenție. Astfel, invenția prevede o metodă de producere a unui anticorp bispecific conform invenției (dintr-o celulă individuală), unde anticorpul bispecific cuprinde două domenii CH3 capabile să formeze o interfață, metoda cuprinzând furnizarea în celula respectivă a) a unei prime molecule de acid nucleic care codifică un lanț greu cuprinzând un prim domeniu CH3, b) a unei a doua molecule de acid nucleic care codifică un lanț greu cuprinzând un al doilea domeniu CH3, unde moleculele de acid nucleic sunt prevăzute cu mijloace de împerechere preferențială a lanțurilor grele cuprinzând primul și al doilea domeniu CH3, metoda respectivă cuprinzând de asemenea etapa de cultivare a celulei gazdă și de permitere a expresiei celor două molecule de acid nucleic și recoltarea anticorpului bispecific din cultură. Prima și a doua moleculă de acid nucleic pot face parte din aceeași moleculă de acid nucleic, vector sau vehicul de livrare genică și pot fi integrate la același situs al genomului celulei gazdă. Alternativ, prima și a doua moleculă de acid nucleic sunt furnizate separat în celulă.

O aplicare preferată prevede o metodă de producere a unui anticorp bispecific conform invenției dintr-o celulă individuală, unde anticorpul bispecific cuprinde două domenii CH3 capabile să formeze o interfață, metoda cuprinzând furnizarea:

- unei celule având a) o primă moleculă de acid nucleic care codifică un lanț greu cuprinzând un situs de legare a antigenului care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei EGFR și care conține un prim domeniu CH3 și b) o a doua moleculă de acid nucleic care codifică un lanț greu cuprinzând un situs de legare a antigenului care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT și care conține un al doilea domeniu CH3, unde moleculele de acid nucleic sunt prevăzute cu mijloace de împerechere preferențială a primului și celui de-al doilea domeniu CH3,

metoda respectivă cuprinzând de asemenea etapa de cultivare a celulei respective și de permitere a expresiei proteinelor codificate de cele două molecule de acid nucleic și recoltarea anticorpului IgG bispecific din cultură. Într-o aplicare preferată în mod special, celula are de

asemenea o a treia moleculă de acid nucleic care codifică un lanț ușor comun. Prima, a doua și a treia moleculă de acid nucleic pot face parte din aceeași moleculă de acid nucleic, vector sau vehicul de livrare genică și pot fi integrate la același situs al genomului celulei gazdă. Alternativ, prima, a doua și a treia moleculă de acid nucleic sunt furnizate separat în celulă. Un lanț ușor comun preferat este bazat pe 012, de preferință este lanțul ușor kappa uman din linia germinală reordonat IgVκ1 39*01/IGJκ1*01, descris mai sus. Mijloacele de împerechere preferențială a primului și celui de-al doilea domeniu CH3 sunt de preferință mutațiile corespunzătoare în domeniul CH3 al regiunilor codificatoare ale lanțului greu. Mutațiile preferate de producere în esență numai a anticorpilor bispecifici sunt substituțiile aminoacidice L351K și T366K (numerotare conform EU) în primul domeniu CH3 și substituțiile aminoacidice L351D și L368E în al doilea domeniu CH3 sau vice versa. Se prevede așadar și o metodă conform invenției de producere a unui anticorp bispecific, unde primul domeniu CH3 cuprinde substituțiile aminoacidice L351K și T366K (numerotare conform EU) și unde al doilea domeniu CH3 cuprinde substituțiile aminoacidice L351D și L368E, metoda respectivă cuprinzând de asemenea etapa de cultivare a celulei respective și de permitere a expresiei proteinelor codificate de moleculele de acid nucleic și recoltarea anticorpului bispecific din cultură. Se prevede de asemenea o metodă conform invenției de producere a unui anticorp bispecific, unde primul domeniu CH3 cuprinde substituțiile aminoacidice L351D și L368E (numerotare conform EU) și unde al doilea domeniu CH3 cuprinde substituțiile aminoacidice L351K și T366K, metoda respectivă cuprinzând de asemenea etapa de cultivare a celulei respective și de permitere a expresiei moleculelor de acid nucleic și recoltarea anticorpului bispecific din cultură. Anticorpilor care pot fi produși prin aceste metode fac de asemenea parte din prezenta invenție. Domeniile de heterodimerizare CH3 sunt de preferință domenii de heterodimerizare IgG1. Regiunile constante ale lanțului greu cuprinzând domeniile de heterodimerizare CH3 sunt de preferință regiuni constante IgG1.

Într-o aplicare invenția prevede o moleculă de acid nucleic care codifică o regiune variabilă a lanțului greu de anticorp conform invenției. Molecula de acid nucleic (în mod tipic o moleculă de acid nucleic *in vitro*, izolată sau recombinantă) codifică de preferință o regiune variabilă a lanțului greu indicată în figura 1 sau o regiune variabilă a lanțului greu indicată în figura 1 având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora. Într-o aplicare preferată, molecula de acid nucleic cuprinde o secvență indicată în figura 2. Într-o altă aplicare preferată, molecula de acid nucleic codifică aceeași secvență aminoacidică precum acidul nucleic indicat în figura 2, dar are o secvență diferită deoarece

codifică unul sau mai mulți codoni diferiți. Invenția prevede de asemenea o secvență de acid nucleic care codifică un lanț greu din Figura 1.

O moleculă de acid nucleic folosită în invenție este în mod tipic, dar nu exclusiv, un acid ribonucleic (ARN) sau un acid dezoxiribonucleic (ADN). Există în domeniu și acizi nucleici alternativi. Un acid nucleic conform invenției este cuprins de exemplu într-o celulă. Când acidul nucleic este exprimat în celula respectivă, celula poate produce un anticorp conform invenției. Așadar, invenția prevede într-o aplicare o celulă cuprinzând un anticorp conform invenției și/sau un acid nucleic conform invenției. Celula este de preferință o celulă de animal, mai preferabil o celulă de mamifer, mai preferabil o celulă de primată, cel mai preferabil o celulă umană. În scopul invenției, o celulă adecvată este orice celulă capabilă să cuprindă și de preferință să producă un anticorp conform invenției și/sau un acid nucleic conform invenției.

Invenția prevede de asemenea o celulă cuprinzând un anticorp conform invenției. De preferință celula (în mod tipic o celulă *in vitro*, izolată sau recombinantă) produce anticorpul. Într-o aplicare preferată, celula este o celulă de hibridom, o celulă ovariană de hamster chinezesc (CHO), o celulă NS0 sau o celulă PER-C6TM. Într-o aplicare preferată în mod special, celula este o celulă CHO. Se prevede de asemenea o cultură celulară cuprinzând o celulă conform invenției. Diferite instituții și companii au dezvoltat linii celulare pentru producerea la scară mare a anticorpilor, de exemplu pentru uz clinic. Exemplele nelimitative de astfel de linii celulare sunt celule CHO, NS0 sau PER.C6. Aceste celule se folosesc și în alte scopuri, cum ar fi producerea proteinelor. Liniile celulare dezvoltate pentru producerea la scară industrială a proteinelor și anticorpilor sunt denumite în prezenta și linii celulare industriale. Astfel, într-o aplicare preferată, invenția prevede utilizarea unei linii celulare dezvoltate pentru producerea la scară mare a anticorpului pentru producerea unui anticorp din invenție. Invenția prevede de asemenea o celulă pentru producerea unui anticorp cuprinzând o moleculă de acid nucleic care codifică un VH, un VL și/sau un lanț greu așa cum se indică în figura 1. De preferință molecula de acid nucleic cuprinde o secvență indicată în figura 2.

Invenția prevede de asemenea o metodă de producere a unui anticorp cuprinzând cultivarea unei celule din invenție și recoltarea anticorpului din cultură. De preferință celula se cultivă într-un mediu fără ser. De preferință celula este adaptată pentru creștere în suspensie. Se prevede de asemenea un anticorp care se poate obține printr-o metodă de producere a unui anticorp conform invenției. Anticorpul este de preferință purificat din mediul de cultură. De preferință anticorpul este purificat cu privire la afinitate.

O celulă din invenție este de exemplu o linie celulară de hibridom, o celulă CHO, o celulă 293F, o celulă NS0 sau un alt tip celular cunoscut ca fiind adecvat pentru producerea anticorpilor în scop clinic. Într-o aplicare preferată în mod special, celula este o celulă umană, de preferință o celulă transformată de o regiune adenovirală E1 sau un echivalent funcțional al acesteia. Un exemplu preferat al unei astfel de linii celulare este linia PER.C6 sau echivalentul acesteia. Într-o aplicare preferată în mod special, celula este o celulă CHO sau o variantă a acesteia, de preferință o variantă care utilizează un sistem vectorial de glutamin sintetază (GS) pentru exprimarea unui anticorp.

Invenția prevede de asemenea o compoziție farmaceutică ce cuprinde un anticorp conform invenției. Compoziția farmaceutică include de preferință un excipient sau vehicul acceptabil farmaceutic. Într-o aplicare preferată, compoziția farmaceutică include 5-50 mM Histidină, 100-300 mM Trehaloză, 0.1-03 g/L PoliSorbit20 sau o combinație a acestora. pH-ul este de preferință setat la pH = 5.5 - 6.5. Într-o aplicare preferată, compoziția farmaceutică include 25 mM Histidină, 220 mM Trehaloză, 0.2 g/L PoliSorbit20 sau o combinație a acestora. pH-ul este de preferință setat la pH = 5.5-6.5, cel mai preferabil la pH = 6.

Un anticorp din invenție mai cuprinde de preferință un marcator, de preferință pentru imagistică *in vivo*. Un astfel de marcator nu este în mod tipic necesar pentru aplicări terapeutice. De exemplu, în contextul unui diagnostic, un marcator poate fi util, de exemplu în vizualizarea celulelor țintă în corp. Sunt adecvați diferiți marcatori și mulți sunt bine cunoscuți în domeniu. Într-o aplicare preferată, marcatorul este un marcator radioactiv pentru detecție. Într-o altă aplicare preferată, marcatorul este un marcator infraroșu. De preferință, marcatorul infraroșu este adecvat pentru imagistică *in vivo*. Există în domeniu diferiți marcatori în infraroșu. Marcatorii infraroșu preferați sunt de exemplu IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye 700DX; IRDye 800RS IRDye 650; IRDye 700 fosforamidit; IRDye 800 fosforamidit (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Lincoln, Nebraska).

Pentru a determina dacă un cancer prezintă un răspuns de creștere la furnizarea unui ligand al unui membru al familiei receptorilor EGF, persoanele cu competențe în domeniu pot determina de exemplu amplificarea EGFR și/sau imuno-histochimia de colorare (pentru un răspuns EGF). Cel puțin 10% din celulele tumorale dintr-o probă de tumoare ar trebui să fie pozitive. Proba tumorală poate conține de asemenea 20%, 30% 40% 50% 60% 70% sau mai multe celule pozitive. Pentru a determina dacă un cancer prezintă un răspuns de creștere la un ligand HER3, persoanele cu competențe în domeniu pot determina de exemplu amplificarea HER3 și/sau colorarea în imunohistochimie. Cel puțin 10% din celulele tumorale dintr-o probă de tumoare ar trebui să fie pozitive. Proba poate conține de asemenea 20%, 30% 40% 50%

60% 70% sau mai multe celule pozitive. Pentru a stabili dacă un cancer va fi sensibil la țintirea receptorului Wnt (LGR5, LGR4, ZNRF3, RNF43), persoanele cu competențe în domeniu pot determina de exemplu amplificarea țintei Wnt și/sau colorarea în imunohistochimie. Cel puțin 1% din celulele tumorale dintr-o probă de tumoare ar trebui să fie pozitive. Proba poate conține de asemenea 5%, 10% 20% 30% 40% 50% sau mai multe celule pozitive.

Cantitatea de anticorp conform invenției care se administrează unui pacient este în mod tipic în intervalul terapeutic, ceea ce înseamnă că se utilizează o cantitate suficientă pentru a obține un efect terapeutic, fără a depăși o valoare prag care duce la un nivel inacceptabil de efecte secundare. Cu cât cantitatea de anticorp necesară pentru a obține un efect terapeutic dorit este mai mică, cu atât mai mare va fi în mod tipic intervalul terapeutic. Se preferă așadar un anticorp conform invenției care exercită efecte terapeutice suficiente la dozaj mic. Dozajul poate

fi în intervalul regimului de dozaj al cetuximab. Dozajul poate fi de asemenea mai mic.

Un anticorp bispecific conform invenției induce de preferință toxicitate redusă a pielii comparativ cu cetuximab în condiții de regim altfel similare. Un anticorp bispecific conform invenției produce de preferință mai puține chemokine proinflamatorii, de preferință CXCL14, în comparație cu cetuximab în condiții de regim altfel similare. Un anticorp bispecific conform invenției de preferință induce perturbare mai redusă a RNazelor antimicrobiene, de preferință Rnaza 7, comparativ cu cetuximab în condiții de regim altfel similare.

Prezenta invenție descrie printre altele anticorpii care ținesc o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al căii de semnalizare WNT și duc la o inhibare puternică a proliferării liniilor celulare canceroase *in vitro* și inhibarea creșterii tumorale *in vivo*. Anticorpul au fost produși ca anticorpi bispecfici prin clonare în vectori de expresie complementară care conțin mutații în regiunea CH3 care activează hetero-dimerizarea lanțurilor grele. S-au produs mulți anticorpi bispecfici la scară mică și s-au testat în teste de legare și funcționale pe linii celulare canceroase. Un anticorp din invenție, în mod specific un anticorp bispecific din invenție, poate combina profiluri de toxicitate redusă cu eficiență mare. Un anticorp din invenție poate fi util în diferite tipuri și linii de terapie direcționată către membri ai familiei EGFR. Un anticorp din invenție poate avea un interval terapeutic mărit comparativ cu un anticorp care leagă aceleași antigene cu ambele brațe. Un anticorp bispecific din invenție poate prezenta efecte mai bune de inhibare a creșterii *in vitro*, *in vivo* sau o combinație a acestora comparativ cu anticorpii MEHD7945A.

Se prevede de asemenea o metodă de contracarare a formării unei metastaze la un subiect având un cancer care exprimă un membru al familiei receptorilor EGF și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Cancerul este de preferință un cancer care răspunde la ligandul receptorului EGF. Nivelurile mari de ligand Her (de ex. EGF, Heregulin) sunt prezente în mod tipic în timpul formării metastazelor (i.e. migrarea, invazia, creșterea și/sau diferențierea celulelor tumorale sau celulelor de inițiere a tumorii). În mod tipic, celulele de inițiere a tumorii se identifică pe baza markerilor celulari stem precum CD44. Aceste procese pot fi așadar slab contracarate cu terapiile cunoscute în prezent, cum ar fi trastuzumab și pertuzumab. Fiindcă un anticorp conform invenției poate contracara creșterea și/sau diferențierea celulelor tumorale sau celulelor de inițiere a tumorii, cum ar fi celule stem canceroase, un astfel de anticorp conform invenției este de asemenea adecvat în mod specific pentru contracararea formării metastazelor. Se prevede de asemenea așadar o metodă de contracarare a formării unei metastaze la un subiect având o tumoare pozitivă pentru EGFR, ErbB-3 sau EGFR/ErbB-3, unde celula tumorală pozitivă pentru EGFR, ErbB-3 sau EGFR/ErbB-3 și/sau celule de țesut stromal înconjurător (de ex. fibroblaste, leucocite cum ar fi macrofage și monocite, endoteliu etc.) are un nivel al expresiei de ligand Her de cel puțin 60%, de preferință cel puțin 70%, mai preferabil cel puțin 80%, mai preferabil cel puțin 85%, mai preferabil cel puțin 90% sau 95% din nivelul expresiei ligandului her al celulelor BXP3 sau MCF7, cuprinzând administrarea la subiect a unui anticorp bispecific sau a unei părți funcționale, a unui derivat și/sau a unui analog al acestuia care leagă o parte extracelulară a EGFR sau HER3, o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al căii de semnalizare WNT. Se prevede de asemenea un anticorp bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia care leagă o parte extracelulară a EGFR sau HER3 și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al căii de semnalizare WNT, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea formării metastazelor. Tumoarea din care provin metastazele este de preferință o tumoare pozitivă pentru ErbB-3 sau EGFR/ErbB-3. Tumoarea și/sau celulele de țesut stromal înconjurător are de preferință un nivel al expresiei de ligand her de cel puțin 60%, de preferință cel puțin 70%, mai preferabil cel puțin 80%, mai preferabil cel puțin 85%, mai preferabil cel puțin 90% sau 95% din nivelul expresiei heregulin al celulelor BXP3 sau MCF7.

Se prevede de asemenea o utilizare a unui anticorp bispecific conform invenției sau a unei părți funcționale, a unui derivat și/sau a unui analog al acestuia, pentru prepararea unui medicament pentru tratarea sau prevenirea formării metastazelor. Tumoarea din care provin aceste metastaze este de preferință o tumoare pozitivă pentru ErbB-3 sau EGFR/ErbB-3.

Tumoarea și/sau celulele de țesut stromal înconjurător are de preferință un nivel al expresiei de ligand her de cel puțin 60%, de preferință cel puțin 70%, mai preferabil cel puțin 80%, mai preferabil cel puțin 85%, mai preferabil cel puțin 90% sau 95% din nivelul expresiei heregulin al celulelor BXPC3 sau MCF7.

Anticorpul din invenție pot fi produși la niveluri > 50 mg/L după transfecția temporară în celule 293F în suspensie. Anticorpul bispecific pot fi purificați la puritate de peste 98%, cu randamente > 70%. Studiile de caracterizare analitică arată profiluri ale anticorpilor IgG1 bispecifici comparabile cu IgG1 monospecific bivalent.

Pentru claritate și o descriere concisă, se descriu aici caracteristici ca parte din aceleași aplicări sau aplicări separate, însă se va înțelege că domeniul de aplicare al invenției poate include aplicări având combinații ale tuturor sau unora din caracteristicile descrise.

În matematică, distanța euclidiană sau metrica euclidiană este distanța "obișnuită" (i.e. rectilinie) între două puncte în spațiul euclidian. Cu această distanță, spațiul euclidian devine un spațiu metric. Norma asociată este denumită norma euclidiană.

Tirozin kinazele receptoare (RTK) sunt receptori de suprafață celulară cu afinitate mare pentru mulți factori de creștere polipeptidici, citokine și hormoni. Din cele 90 de gene tirozin kinazice unice, cunoscute în prezent, identificate în genomul uman, 58 codifică proteine de tirozin kinaze receptoare. S-a arătat că tirozin kinazele receptoare sunt relevante pentru procese celulare normale, dar au de asemenea un rol în dezvoltarea și evoluția cancerului. Tirozin kinazele receptoare conțin cel puțin un domeniu extracelular.

Într-un aspect, invenția prevede o proteină care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor RTK și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT. Proteina este de preferință un anticorp, de preferință un anticorp bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia.

Invenția mai prevede un anticorp bispecific sau o parte funcțională, un derivat și/sau un analog al acestuia care leagă o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al familiei receptorilor RTK și o parte extracelulară a unui membru asociat cu membrana al unei căi de semnalizare WNT.

Se prevede de asemenea o metodă de tratare a unui individ având un cancer, metoda cuprinzând administrarea unei proteine din invenție sau a unui anticorp bispecific din invenție la individul în nevoie.

Invenția prevede de asemenea o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție, pentru utilizare în tratarea unui individ având cancer.

Într-o aplicare, cancerul este un cancer care răspunde la ligandul membrului respectiv al familiei receptorilor RTK și un cancer care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Se prevede de asemenea un sistem celular cuprinzând o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție și o celulă care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor RTK și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT. Sistemul celular este de preferință un sistem celular cuprinzând o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție și o celulă care exprimă un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor RTK și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Se prevede de asemenea un sistem care permite inhibarea creșterii/proliferării celulei, metoda cuprinzând prevederea sistemului cu o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului RTK și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT într-un sistem care permite creșterea/proliferarea celulei, metoda cuprinzând prevederea sistemului cu o proteină din invenție sau un anticorp bispecific din invenție. Celula este de preferință o celulă care răspunde la ligandul receptorului RTK și care exprimă un membru asociat cu membrana al căii WNT.

Membrii preferați ai familiei receptorilor RTK sunt familia menționată a receptorilor EGF și c-MET; Axl și MST1R.

MET sau C-MET este o tirozin kinază receptoare de o singură trecere relevantă pentru dezvoltarea embrionară, organogeneza și vindecarea rănilor. Factorul de creștere a hepatocitelor/factorul dispersant (HGF/SF) și izoforma sa de matisare (NK1, NK2) sunt liganzii cunoscuți în prezent ai receptorului MET. MET este exprimat în mod normal de celule de origine epitelială, în timp ce expresia HGF/SF este observată în celule de origine mezenchimală. Când HGF/SF leagă receptorul său asociat MET, induce activarea. Met este cunoscut de asemenea ca proto-oncogenă MET, tirozin kinază receptoare; receptorul factorului de creștere a hepatocitelor; tirozin protein kinaza Met; receptorul factorului dispersant; proto-oncogenă C-Met; receptorul HGF/SF; receptorul HGF; receptorul SF; EC 2.7.10.1; proto-oncogenă tirozin kinaza Met; proto-oncogenă Met; EC 2.7.10; AUTS9; RCCP2; C-Met; și HGFR 3. Numerele de referință pentru genă și proteină sunt NC_000007.14; NT_007933.16; NC_018918.2; NP_000236.2; NP_001120972.1. Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a C-MET ca o țintă, secvența proteinei C-MET legate de un anticorp putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului C-

MET leagă C-MET și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru C-MET.

AXL sau tirozin kinaza receptoare AXL codifică receptorul tirozin protein kinazei receptoare UFO, care este o enzimă codificată la om de gena AXL. Alte denumiri pentru AXL sunt tirozin kinaza receptoare AXL; oncogena AXL; EC 2.7.10.1; UFO; receptorul tirozin protein kinazei UFO; secvența/gena de transformare AXL; EC 2.7.10; JTK11; Tyro7; și ARK 3. Numerele de referință pentru genă și proteină sunt NC_000019.10; NC_018930.2; NT_011109.17; NP_001265528.1; NP_001690.2; NP_068713.2). Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a AXL ca o țintă, secvența proteinei AXL legate de un anticorp putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului AXL leagă AXL și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru AXL.

MST1R sau receptorul de stimulare a macrofagelor 1 sau RON. Alte denumiri pentru MST1R sunt receptorul de stimulare a macrofagelor 1; RON; PTK8 protein tirozin kinaza 8; tirozin kinaza asociată cu C-Met; receptorul MSP; EC 2.7.10.1; P185-Ron; CDw136; PTK8; receptorul de stimulare a macrofagelor 1 (tirozin kinaza asociată cu C-Met) 3; receptorul proteinei de stimulare a macrofagelor; protein-tirozin kinaza 8; MST1R varianta RON30; MST1R varianta RON62; RON varianta E2E3; RON varianta 21; antigen CD136; EC 2.7.10; CD136, toți în formă legată de membrană. Numerele de referință pentru genă și proteină sunt NC_000003.12; NT_022517.19; NC_018914.2; NP_001231866.1; NP_002438.2. Numerele de referință sunt date în principal pentru a asigura o metodă suplimentară de identificare a MST1R ca o țintă, secvența proteinei MST1R legate de un anticorp putând varia, de exemplu din cauza unei mutații în gena codificatoare cum ar fi cele care apar în unele cancere etc.. Situsul de legare a antigenului MST1R leagă MST1R și o varietate de variante ale acestuia, cum ar fi cele exprimate de unele celule tumorale pozitive pentru MST1R.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5777 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR4, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5781 indicată în figura 1 având cel mult 15,

de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5790 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5803 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5814 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5816 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5817 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă LGR5, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5818 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă RNF43, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5832 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă RNF43, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5836 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5850 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5853 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5855 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care

leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5884 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția mai prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă ZNRF3, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF5888 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5
- inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Într-o aplicare, invenția prevede un anticorp monospecific cuprinzând domenii variabile care leagă EGFR, unde lanțul VH al domeniilor variabile cuprinde

- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1; sau
- secvența aminoacidică a lanțului VH MF3755 indicată în figura 1 având cel mult 15, de preferință 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 și de preferință având 1, 2, 3, 4 sau 5 inserții, deleții, substituții aminoacidice sau o combinație a acestora față de VH.

Invenția se referă la un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39. S-a arătat că reziduurile aminoacidice D43; G44, M46, F67, G90 și F91 sunt implicate în legarea anticorpului. 'Implicate în' nu înseamnă neapărat că toate reziduurile intră într-adevăr în contact cu anticorpul. Fără limitare teoretică, se crede că substituția D43A sau G44A duce la o (ușoară) modificare structurală a epitopului și că modificarea structurală duce la legare redusă a anticorpului de epitop.

Interacțiunea anticorpului cu LGR5 nu inhibă legarea RSPO 1 de LGR5 exprimat pe membrana unei celule care exprimă LGR5. Interacțiunea anticorpului cu RSPO 1 nu inhibă legarea anticorpului de LGR5 exprimat pe membrana unei celule care exprimă LGR5. Aceasta

înseamnă că anticorpul și RSPO1 nu concurează unul cu celălalt pentru legare de LGR5, cel puțin nu în intervalul raportului molar indicat în prezenta. Raportul molar dintre anticorp și RSPO 1 este în mod tipic de la 0,1 la 0,001 (inclusiv), de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,01 (inclusiv). În acest interval legarea anticorpului de LGR5 nu inhibă (blochează) legarea RSPO 1 de LGR5.

Când se menționează în prezenta raporturi molare între anticorp și RSPO, se preferă ca anticorpul să fie prezent în cantități care duc la 40%-80% din legarea obținută când sunt prezente cantități de saturare ale anticorpului.

Au fost descriși diferiți anticorpi care se leagă de LGR5. Legarea unui anticorp de LGR5 poate bloca legarea unei Rspundine de LGR5 sau nu. S-a constatat că anticorpii care blochează legarea ligandului Rspundin 1 de LGR5 se leagă de o regiune incluzând regiunea N-terminală, regiunea 1 a repetițiilor bogate în leucină (LRR) și LRR2 a proteinei (Lau et al 2011; Nature vol 476; pp 293-297 și informațiile suplimentare descrise acolo). Elementele sunt conținute în aminoacizii 21-118 (inclusiv) ai unei secvențe proteice LGR5 indicate în SEQ ID NO: 1 din figura 39; unde aminoacizii 21-70 alcătuiesc regiunea N-terminală, aminoacizii 71-94 (inclusiv) alcătuiesc LRR1 și 95-118 alcătuiesc LRR2. Au fost raportați în domeniu doar câțiva anticorpi care nu blochează interacțiunea LGR5 cu Rspundin 1 și, din cele mai bune cunoștințe ale inventatorului, nici unul din aceștia nu leagă regiunea N-terminală a LGR5.

Invenția prevede acum o proteină care se leagă de un epitop în reziduurile aminoacidice 21-118 ale unei secvențe LGR5 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39, unde proteina nu blochează legarea Rspundin 1 de LGR5.

Testul de determinare dacă un anticorp blochează sau nu legarea unei Rspundine de LGR5 include de preferință celule CHO care exprimă LGR5 pe membrana celulară. Anticorpul și Rspundin de analizat se amestecă și se adaugă în celule, determinându-se legarea anticorpului de celule. Cantitatea de legare a anticorpului de celule care exprimă LGR5 în prezența unui surplus de Rspundin indică faptul că anticorpul nu blochează legarea Rspundin de LGR5. Testul mai include de preferință un anticorp de control care leagă LGR5 și care blochează legarea Rspundin de LGR5. Anticorpul de control este de preferință anticorpul PB10261 sau OMP88R20 descris în exemple. O proteină nu blochează legarea Rspundin 1 de LGR5 dacă, în condiții altfel identice, se poate lega de celulele care exprimă LGR5 mai multă proteină decât anticorpul de control. Aceasta se evaluează de preferință în condiții în care raportul molar dintre proteină sau anticorpul de control și Rspundin este 1:10 sau mai mic, i.e. 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001 (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv). Proteina leagă de preferință și o parte extracelulară a unei alte

proteine asociate cu membrana. Într-o aplicare preferată, cealaltă proteină asociată cu membrana este un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET.

Invenția mai prevede o proteină care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde legarea proteinei de LGR5 este redusă cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A. Într-o aplicare preferată, interacțiunea Rspodin (RSPO) 1 cu LGR5 pe o celulă care exprimă LGR5 nu inhibă legarea proteinei de LGR5 cu mai mult de 20%. Inhibarea legării proteinei de LGR5 se măsoară de preferință când proteina și RSPO 1, 2, 3 sau 4 sunt prezente într-un raport molar de 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001, (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv) (proteină:RSPO).

Invenția prevede de asemenea o proteină care poate lega un epitop pe LGR5 situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde interacțiunea RSPO 1 cu LGR5 pe o celulă care exprimă LGR5 nu inhibă legarea proteinei de LGR5 cu mai mult de 20% când proteina și RSPO 1 sunt prezente într-un raport molar de 0,1 sau mai mic; de preferință într-un raport molar între 0,1 și 0,001, (inclusiv), de preferință 0,1 până la 0,01 (inclusiv). Epitopul este de preferință situat în reziduurile aminoacidice 40-95 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39. Legarea proteinei de LGR5 este redusă de preferință cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A. Aceasta indică în mod tipic că proteina interacționează cu acești aminoacizi menționați. Schimbarea acestor aminoacizi modifică legarea proteinei de LGR5. Acești aminoacizi pot fi așadar reziduuri de contact în LGR5 pentru proteina de legare. În cazul din prezenta, inventatorii consideră că reziduurile M46; F67, G90A și F91 sunt reziduuri de contact. Și D43 și G44 pot fi reziduuri de contact, dar pot fi de asemenea reziduuri care modifică structura specifică a altor reziduuri astfel încât nu mai pot fi legate de proteină. Proteina poate lega de preferință o altă proteină. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) sau cMET. Proteina de legare LGR5 discutată în prezenta este de preferință un anticorp, de preferință un anticorp bispecific.

Invenția prevede de asemenea un anticorp bispecific cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde legarea domeniului variabil de LGR5 este redusă cu una sau mai multe dintre următoarele substituții ale

reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A; anticorpul bispecific mai cuprinde un domeniu variabil care poate lega o altă proteină. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET.

Legarea proteinei sau anticorpului bispecific menționat în prezenta de membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET reduce de preferință semnalizarea indusă de ligand într-o celulă cuprinzând membrul asociat cu membrana al familiei receptorilor EGF sau cMET.

Invenția prevede un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39.

Invenția prevede de asemenea un anticorp care leagă un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, unde reziduurile aminoacidice D43; G44, M46, F67, G90 și F91 sunt implicate în legarea anticorpului de epitop.

Invenția prevede de asemenea un anticorp care leagă un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, unde una sau mai multe dintre substituțiile reziduurilor aminoacidice din D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A reduce legarea anticorpului de epitop.

Invenția prevede de asemenea un anticorp cuprinzând un domeniu variabil care poate lega un epitop pe o parte extracelulară a LGR5, epitopul fiind situat în reziduurile aminoacidice 21-118 din SEQ ID NO: 1 indicată în figura 39 și unde legarea anticorpului de epitop este redusă de una sau mai multe dintre următoarele substituții ale reziduurilor aminoacidice D43A; G44A, M46A, F67A, G90A și F91A.

O proteină membranară în sensul folosit în prezenta este o proteină de membrană celulară, i.e. o proteină care se găsește în membrana exterioară a unei celule, membrana care separă celula de mediul exterior. Proteina membranară are o parte extracelulară. O proteină membranară se află cel puțin pe o celulă dacă include o regiune transmembranară în membrana celulei.

Anticorpul mai cuprinde de preferință un alt domeniu variabil care poate lega o altă proteină. Proteina suplimentară este de preferință o proteină membranară cuprinzând o parte extracelulară. Proteina suplimentară este de preferință un membru asociat cu membrana al familiei receptorilor pentru factorul de creștere epidermic (EGF) sau cMET. Anticorpul este un anticorp bispecific.

Pentru claritate și o descriere concisă, se descriu aici caracteristici ca parte din

aceleași aplicări sau aplicări separate, însă se va înțelege că domeniul de aplicare al invenției poate include aplicări având combinații ale tuturor sau ale unora din caracteristicile descrise.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1: Secvențe aminoacidice ale fragmentelor VH descrise în prezenta cerere. Sunt indicate regiunile CDR1, CDR2 și CDR3, precum și regiunile FR1, FR2, FR3 și FR4.

Figura 2: Secvențe nucleotidice ale cADN-urilor care codifică VH selectate descrise în prezenta cerere.

Figura 3: Secvența adnotată a lanțului ușor comun (cLC).

Figura 4: Secvența aminoacidică adnotată a regiunii Fc (CH1-CH3) a anticorpilor testați în prezenta cerere.

Figura 5: Efectul factorilor de creștere EGF și HRG asupra morfologiei tumoroidelor P14T și P18T.

Exemplu al efectului factorilor de creștere EGF și HRG asupra morfologiei tumoroidelor P14T și P18T. Factorii de creștere induc o modificare simultană a dimensiunii tumoroidelor, a dimensiunii lumenului și a distribuției lumenului. Combinația acestor trei parametri morfologici localizează organoizii observați într-un spațiu unic. Distanța euclidiană poate fi calculată pe baza combinației acestor trei caracteristici cu lipsa factorului de creștere (fără GF) ca un punct de referință. Distanța euclidiană este apoi modificarea direcției X, Y și Z indusă de tratamente.

Figura 6: Analiza FACS a serurilor de la animale imunizate ZNRF3 care se leagă de celule Freestyle 293F care au supraexprimat stabil antigenului, prelevate în ziua 35.

Serurile au fost testate în comparație cu serurile din ziua 0 (pre-imune) pentru legare de linia celulară 293F Freestyle care exprimă stabil ECD al ZNRF3. Fiecare grup prezintă un strat de celule de control (necolorate) (umplute cu gri) și celule colorate cu serurile respective (neumplute). Șoarecii sunt numerotați L19-L24; colorările de control sunt indicate în partea dreaptă a figurii n.c.: control negativ.

Figura 7: Exemplul colorării FACS a unui amestec de celule care supraexprimă ZNRF3 marcat cu DiD și celule 293F freestyle nemarcate (celule mamă) folosind preparate de clone fagice monoclonale selectate.

Fiecare punct reprezentat este un strat de celule necolorate și celule colorate cu un Fab

selectat exprimat pe fag. Jumătatea superioară a fiecărei casete indică celule antigen-pozitive marcate cu DiD și jumătatea inferioară a casetei indică celule 293F freestyle antigen-negative nemarcate. Din cele șase clone indicate în figură (marcate 1-6), patru sunt antigen-specifice (1, 3, 4 și 6) și două (2 și 5) sunt nereactive. Controlul pentru expresia proteinei a fost colorarea cu anticorpii direcționați către motivul epitopului derivat din cMyc și controlul negativ a fost colorarea numai cu anticorpii secundari (anti-M13 și Strep-PE).

Figura 8: Clasificarea afinității IgG monovalent direcționat către hLGR5 (în combinație cu fragmentul Fab al toxoidului tetanic) pe suprafața celulară a celulelor Freestyle 293F care supraexprimă hLGR5.

Se indică un exemplu al întregului grup. S-a testat o serie de diluție de două ori a IgG (5 μg/ml - 0,08 μg/ml) pe un număr fix de celule (5x10⁵ celule/godeu) care exprimă stabil hLGR5. Intensitatea medie a fluorescenței (MFI) s-a măsurat pentru fiecare punct de date și s-a reprezentat față de cantitatea în creștere a IgG folosit pentru colorare. Din fiecare IgG s-a calculat zona de sub curbă (AUC) pe baza curbelor individuale și s-a folosit pentru clasificare. Tabelul (casetă din dreapta) indică valorile AUC ale IgG bispecific indicate în grafic (casetă din stânga). Pe baza valorilor AUC s-au clasificat IgG cu privire la afinitatea de legare de țintă.

Figura 9: Capacitatea de blocare rhR-Spondin3 a IgG de legare monovalent hLGR5 (în combinație cu un fragment Fab TT) s-a testat în ELISA de blocare R-Spondin.

Se indică un exemplu reprezentativ pentru grupul LGR5. Legarea maximă (normalizată la 0%) a fost stabilită prin legarea neinhibată de 2 μg/ml rhR-Spondin3 acoperit folosind 0,031 μg/ml rhLGR5-Fc și detectarea cu un anticorp anti-Fc. Valoarea OD_{450nm} pentru legarea maximă a fost stabilită la 100%. Surplusul de R-Spondin3 indică adăugarea R-Spondin3 în exces (15 μg/ml) cu rol de control pozitiv pentru competiție. IgG bispecific, testat la 15 μg/ml, valorile OD_{450nm} au fost normalizate pe baza semnalului maxim și sunt indicate cu coloanele albastre. S-a considerat că clonele blochează parțial atunci când procentajul a fost sub 80% și s-a considerat că blochează atunci când procentajul a fost sub 50%. Acest exemplu indică un grup reprezentativ de fragmente LGR5/TT IgG care țintesc LGR5.

Figura 10: Efectele de inhibare a creșterii ale anticorpului de referință PG3755 (EGFR bivalent, mono-specific) și PB10651 (EGFR/LGR5 bispecific) asupra liniei tumoroid P18T în prezența a 5 ng/ml EGF în mediul de cultură.

Anticorpii inversează fenotipul tumoroid indus de EGF la un fenotip stimulat fără factor de creștere (prima coloană). PB10651 este activ ca un inhibitor al creșterii la doze mai mici decât anticorpii de referință bispecific EGFR PG3755.

Figura 11: Exemplul rezultatelor selecției de validare pentru un tumoroid de colon expus la anticorpi bispecfici care țintesc EGFR/WNT și tratamente de control.

Cu cât distanța euclidiană este mai mică, cu atât mai puternic este efectul tratamentului; 1 înseamnă creștere normală. PB10651 (anticorp EGFR/LGR5 cu MF3755xMF5816) indică inhibarea completă a creșterii la doza testată (2μg/ml) și depășește Cetuximab.

Figura 12: PB10651 reține imunoreactivitatea după marcarea cu ^{125}I .

Imunoreactivitatea proteinei marcate radioactive. A: test Lindmo pentru brațul Fab anti-EGFR în PB10651; B: test Lindmo pentru brațul Fab anti-LGR5 al PB10651. A existat foarte puțină pierdere de imunoreactivitate după marcarea proteinei cu ^{125}I .

Figura 13: PB10651 se leagă cu afinitate sub-nanomolară de EGFR și LGR5.

Analiza de afinitate a legării PB10651 de LGR5 și EGFR. A: analiza legării PB10651 de celule CHO-LGR5; B: analiza legării PB10651 de celule CHO-EGFR și C: analiza de afinitate a legării PB10651 de celule DLD-1.

Figura 14: Brațul Fab anti-EGFR în PB10651 se leagă de reziduuri din domeniul III al EGFR, așa cum se determină prin analiza de mutagenză shotgun.

Este indicat epitopul de pe EGFR recunoscut de brațul Fab anti-EGFR prezent în PB10651, modelat pe structura EGFR (Li et al., 2005; referință pdb 1YY9). Reziduurile observate ca fiind relevante pentru legarea PB10651 sunt evidențiate în structură.

Figura 15: Brațul Fab anti-LGR5 în PB10651 se leagă de reziduurile prezente în domeniul N-CAP și prima repetiție bogată în leucină a LGR5, așa cum se determină prin analiza de mutagenză shotgun.

Figura indică epitopul de pe LGR5 recunoscut de PB10651, modelat pe structura LGR5 în complex cu RSPO1 (Peng et al., 2013; referință pdb 4BSR). Reziduurile recunoscute sunt indicate cu negru în stânga (gri deschis) molecula LGR5 a dimerului. Se indică structura RSPO1.

Figura 16: Versiunea copiată a anticorpului OMP88R20 anti-LGR5 este inhibată dependent de doză pentru legarea LGR5 de ligandul R-spondin1.

Versiunea copiată a OMP88R20 (PG7711) a fost testată cu privire la legare la EC50 (50ng/ml) pentru legare de celule care supraexprimă LGR5 în prezența cantităților în creștere de R-spondin1. Valoarea MFI obținută a fost normalizată la valoarea de control (fără R-spondin1).

Figura 17: MF5816 Fab anti-LGR5 prezent în PB10651 nu este inhibat pentru legarea LGR5 într-un excedent molar mare al ligandului R-spondin1.

Versiunea copiată a OMP88R20 (PG7711) a fost testată cu privire la legare la 50ng/ml și

anticorpilor bispecfici s-au testat la 100ng/ml pentru legare de celule care supraexprimă LGR5 în prezența concentrațiilor în creștere de R-spondin1 sau a anticorpului de șobolan 1D9. Legarea anticorpilor indicați s-a detectat cu un anticorp secundar IgG anti-uman marcat cu PE. Pentru fiecare punct al curbei, valoarea MFI obținută a fost normalizată (împărțită) la valoarea descoperită în situația de control (fără R-spondin1).

Figura 18: PG3755 monospecific, bivalent, inhibă puternic semnalizarea mediată de EGFR. Proliferarea (măsurată ca număr de impulsuri de fluorescență după adăugarea alamar blue în celule: axa Y) celulelor A431 s-a măsurat în prezența a 62.5ng/ml de EGF uman și a cantităților în creștere a anticorpilor anti-EGFR indicați. PG1337 a avut rol de control fără legare (negativ). Un număr în creștere al impulsurilor indică un număr crescut de celule și așadar blocarea semnalizării mediate de EGFR.

Figura 19: PB10651 afucozilat se leagă cu afinitate comparabilă de ortologi de macac ai EGFR și LGR5.

Valorile MFI obținute după colorare cu anticorpul indicat la concentrația indicată în FACS sunt indicate în funcție de concentrația anticorpului folosit. Pentru EGFR, cetuximab s-a folosit ca un control pozitiv pentru legarea EGFR de macac. Pentru LGR5, versiunea copiată a hu8E11v2 (PG7543) de la Genentech s-a folosit ca un control pozitiv pentru legarea LGR5 de macac.

Figura 20: Colorarea organoidelor derivate de la pacienți în FACS folosind anticorpi bispecfici anti-LGR5/EGFR principalii vizualizează expresia LGR5.

O probă de organoid obținută de la un pacient cu cancer colorectal (P18) a fost colorată folosind doi anticorpi anti-LGR5 diferiți (MF5816 și MF5814) și un control negativ care recunoaște toxina tetanică (TT). Colorarea anticorpului TT s-a folosit pentru stabilirea pragului pentru colorarea celor doi anticorpi anti-LGR5. Cu colorarea TT stabilită la 0.8%, anticorpilor MF5816 și MF5814 au prezentat niveluri de colorare comparabile, 53.6% și 52.7% dintre celule fiind pozitive pentru expresia LGR5.

Figura 21: Colorarea și sortarea organoidelor provenite de la pacienți folosind anticorpi bispecfici anti-LGR5/EGFR principalii îmbogățesc celule (stem canceroase) care exprimă LGR5.

S-a folosit o linie de organoid de cancer colorectal (P18T) pentru colorarea FACS și sortarea primelor (pozitive) și ultimelor (negative) 15% dintre celulele colorate identificate de anticorpi anti-LGR5 MF5814 și MF5816. S-au sortat 2000 de celule individuale pentru fiecare populație și s-au folosit pentru a genera cADN pentru PCR cantitativ. Expresia B2M s-a folosit ca un control endogen și expresia mRNA LGR5 în fracțiunea pozitivă a fost reprezentată față de fracțiunea negativă folosind metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ și software StepOne 2.2 plus. Experimentul s-a

desfășurat în două ocazii separate (Exp.1 și Exp. 2), cu fiecare anticorp, și repetări experimentale, prezentând o creștere a mARN LGR5 în fracțiunea pozitivă față de cea negativă. Barele de eroare reprezintă max. de cuantificare relativ, produs ca parte din analiză, folosind software StepOne 2.2 plus.

Figura 22: Sortarea organoidului provenit de la pacient pentru celule care exprimă LGR5 folosind anticorp bispecific anti-LGR5/EGFR principal îmbogățește celulele de inițiere a tumorilor.

Stânga: imaginile organoidelor indică una din picăturile BME și au fost captate cu un microscop Olympus MVX10 MacroView. Inserția din imaginea MF5816 indică o vedere mai de îndeaproape a unuia dintre organoide în picătură. Dreapta: histograma indicând numărul organoidelor după două săptămâni de creștere în populația de celule LGR5-pozitive și negative.

Figura 23: Tratamentul organoidelor provenite de la pacienți cu anticorp bispecific anti-LGR5/EGFR principal inhibă puternic excrescența organoidului.

Stânga: histograme care indică numărul mediu al organoidelor (sus) și dimensiunea organoidelor (jos) după diferitele tratamente cu anticorpii indidicați (sub grafice). Dreapta: exemple reprezentative ale imaginilor obținute de la organoide după tratamente diferite. Celulele individuale au fost însămânțate și lăsate să formeze organoide trei zile. În a treia zi, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu mediu conținând anticorpii la o concentrație de 2μg/mL. Organoidele au fost cultivate alte 7 zile. În ziua 7, organoidele au fost scanate folosind un Olympus ScanR cu obiectiv optic x4 și numărul de organoide a fost cuantificat folosind ImageJ derulat în macro proiectat intern. Datele sunt prezentate față de controlul TT și s-a realizat un T-Test bilateral, cu probe împerecheate, pentru a evalua diferențele semnificative între tratamente. Barele de eroare reprezintă abaterea standard. $*=p\leq 0.05$ față de TT, $**=p\leq 0.001$ față de TT. $\# = p\leq 0.05$ față de EGFR-TT, $\## = p\leq 0.001$ față de EGFR-TT.

Figura 24: Anticorpii bispecifici LGR5xEGFR permit reducerea populației celulare nediferențiate.

Celulele individuale au fost însămânțate și crescute trei zile înaintea tratamentului cu anticorpi. După șapte zile, ARN total a fost extras și folosit pentru analiza PCR cantitativă în timp real pentru a detecta nivelurile mARN ale LGR5 și CK20 (un marker al diferențierii). Diferențele de expresie au fost detectate folosind metoda 2-ΔΔCT. Datele sunt prezentate față de controlul negativ (TT-TT). Experimentul s-a efectuat de două ori, separat, și se indică media celor două experimente. Barele de eroare reprezintă abaterea standard a celor două experimente.

Figura 25: Exemple de superclustere indicând modificările aminoacidice tolerate într-un VH și/sau CDR din prezenta invenție fără pierderea specificității de legare.

Figura 26: Compararea potențialului PB10651 *versus* Cetuximab în inhibarea creșterii tumoroidelor provenite de la pacienți și organoidelor provenite din țesut normal *in vitro*

Exemple ale efectelor tratamentelor cu intervalele de concentrație ale PB10651 și Cetuximab asupra culturilor de organoide din organoide provenite din țesut normal și din țesut canceros (A și B). Figura 26C: valorile IC50 pentru inhibarea creșterii obținute folosind tumoroide provenite de la pacienți și organoide provenite din țesut normal. Raportul din a treia coloană indică raportul IC50(Cetuximab) / IC50(PB10651).

Figura 27: PB10651 este semnificativ mai puternic decât anticorpul monospecific anti-EGFR și anti-LGR5 în inhibarea creșterii organoidelor *in vitro*.

Tratamentul *in vitro* al culturilor de organoid p18T (A) și C1M (B) în 3D cu anticorpul indicați. Dimensiunea organoidelor este reprezentată în funcție de concentrația anticorpului folosit. Anticorpul anti-LGR5 nu prezintă efecte asupra creșterii organoidelor;

Figura 28: PB10651 este mai potent în reducerea creșterii organoidelor *in vitro* decât un amestec al anticorpilor monospecifici, bivalenți, primari.

Figura indică efectele de inhibare a creșterii ale anticorpilor de referință PG3755 (EGFR bivalent, mono-specific), PG5816 (LGR5 bivalent, mono-specific) sau ale unei combinații echimolare a acestora și PB10651 (EGFR/LGR5 bispecific) asupra liniei tumoroid P18T în prezența EGF. A. Dimensiunea organoidului P18T este indicată în funcție de concentrația anticorpului folosit pentru tratament. Organoidele tratate cu PG5816 nu au prezentat inhibare a creșterii; PG3755 a redus semnificativ creșterea, dar nu la același nivel precum PB10651. Combinația de PG3755 și PG5816 a fost de asemenea semnificativ mai puțin potentă decât PB10651 în inhibarea creșterii tumoroidelor P18T. B. O comparație a valorilor IC50 pentru inhibarea creșterii pentru tratamentul organoidelor indicate (sus) cu anticorpul indicați (caseta din stânga). Valorile IC50 rezultate pentru PB10651 sunt întotdeauna mai mici decât cele rezultate pentru amestecul de anticorpi primari.

Figura 29: Tratamentul organoidelor *in vitro* cu PB10651 cauzează localizare intracelulară a anticorpului care nu se observă cu anticorpi monospecifici, bivalenți, direcționați către LGR5 sau EGFR.

După 24 de ore de tratament cu anticorpi, organoidele au fost fixate, permeabilizate și colorate pentru IgG uman pentru a indica localizarea (sub-)celulară a anticorpului. Numai în cazul PB10651, s-a observat o colorare intracelulară punctată care a fost absentă în organoidele

tratate cu anticorpi monospecfici, bivalenți. În acest al doilea caz, anticorpul a fost concentrat și localizat pe membrana celulară.

Figura 30: Organoidele care răspund la tratament cu PB10651 prezintă localizare intracelulară a anticorpului, care nu se observă după tratamentul organoidelor care nu răspund la tratament.

După 24 de ore de tratament cu anticorpi, organoidele au fost fixate, permeabilizate și colorate pentru IgG uman pentru a indica localizarea (sub-)celulară a anticorpului. Diferitele organoide care au răspuns la tratament cu PB10651 (C0M, C55T, P18T, C31M) au prezentat colorare intracelulară a anticorpului, în timp ce organoidele care nu au răspuns au prezentat localizare pe suprafața celulară a PB10651 (C28T, P19Tb, P8T, C51N).

Figura 31: Hărțile vectorilor plasmidelor MV1453 și MV1626.

Figura 32: Harta vectorului MV1622 (vector de expresie RMD).

Figura 33: Profilul CEX-HPLC al PB10651 afucozilat.

Figura 34: Rezultatele testului reporter ADCC al PB10651(ADCC mărită) față de PB10651(nemărită) și PG1337 (control).

Figura 35: Expresia EGFR și LGR5 în modele de xenogrefă de la pacienți (PDX).

Expresia genelor EGFR și LGR5 în studiu viu și tumori congelate a fost măsurată prin PCR în timp real TaqMan. Expresia este reprezentată ca valoarea log-transformată obținută cu metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$, folosind GAPDH ca genă de menaj. Tumorile extrase din animale vii au prezentat valori ale expresiei genice similare cu tumorile de referință.

Figura 36: PB10651 inhibă creșterea *in vivo* a PDX.

Modelele de PDX colorectale au fost tratate săptămânal (săgeți) cu PB10651 sau Cetuximab sau PBS. Creșterea tumorii (indicată în mm³) a fost monitorizată în timpul și după oprirea tratamentului. Modelele care răspund la cetuximab (un WT și un mutant KRAS G13D) au răspuns și la PB10651. Unul din trei modele de mutant KRAS G12V/D care nu au răspuns la Cetuximab au prezentat inhibare semnificativă a creșterii tumorale cu PB10651.

Figura 37: Tratamentul cu PB10651 cauzează o scădere semnificativă a numărului de celule care se înmulțesc în tumoare.

Colorarea imunohistochimică a tumoroidelor P18 după 48 de ore de tratament (2 μg/mL). Caseta de sus indică un marker al proliferării (ki67), iar caseta de jos, un marker al apoptozei (caspaza-3 clivată). Imaginile au fost obținute folosind un obiectiv x20, colorarea cu maro indică expresia, nucleii fiind contracolorați cu hematoxilină.

Figura 38: PB10651 este semnificativ mai potent decât cetuximab în inhibarea creșterii organoidelor *in vivo*.

A Efectul dozajului săptămânal de anticorp asupra creșterii xenogrefei P18.

După ce tumorile au atins o dimensiune medie de 50 mm³ anticorp, au început tratamentele (ziua 0) și se reprezintă modificarea relativă a volumului. Șoarecii au fost tratați o dată pe săptămână (așa cum indică săgețile). Se face și se reprezintă media tuturor volumelor tumorale dintr-un grup de tratament; numărul de xenogrefe la fiecare punct de timp este reprezentat în tabel. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei. *=P<0.01 comparativ cu PBS, #=P<0.01 comparativ cu cetuximab, determinat prin analiza t-test împerecheat.

B. Efectul dozajului săptămânal de anticorp asupra creșterii xenogrefei C31M.

După ce tumorile au atins o dimensiune medie de 30 mm³ anticorp, au început tratamentele (ziua 0) și se reprezintă modificarea relativă a volumului. Șoarecii au fost tratați o dată pe săptămână (așa cum indică săgețile). Se face și se reprezintă media tuturor volumelor tumorale dintr-un grup de tratament; numărul de xenogrefe la fiecare punct de timp este reprezentat în tabel. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei. *=P<0.01 comparativ cu PBS, #=P<0.05 comparativ

cu cetuximab, determinat prin analiza t-test împerecheat.

Figura 39: Secvența aminoacidică adnotată a LGR5 uman.

Liderul indică secvența aminoacidică decupată din proteina matură, regiunea N acoperă aminoacizii 21-70, inclusiv; LRR reprezintă regiunea cu repetiții bogate în leucină, LLR1 reprezintă regiunea 1 cu repetiții bogate în leucină; LRR2 reprezintă regiunea 2 cu repetiții bogate în leucină etc. LLR1 începe la aminoacidul 71 și se termină la aminoacidul 94 (inclusiv); LLR2 începe la 95 și se termină la 118, inclusiv. CRL este regiunea linker bogată în cisteină. TM indică diferitele regiuni transmembranare, iar C-TERM capătul c-terminal al proteinei. Părțile adnotate formează împreună o secvență consecutivă indicată SEQ ID NO: 1. Această secvență completă este SEQ ID NO: 1. Această numerotare prevalează chiar dacă, din unele motive, o altă secvență este indicată de asemenea ca SEQ ID NO: 1.

Figura 40: Secvența aminoacidică adnotată a EGFR uman, de tip sălbatic (GenBank NM_005228).

Se indică peptida de semnal, partea extracelulară, helixul trans-membranar anticipat și tirozin kinaza intracelulară incluzând coada C-terminală. The annotated parts together form one consecutive sequence designated SEQ ID NO: 2. Părțile adnotate formează împreună o secvență consecutivă indicată SEQ ID NO: 2. Această numerotare prevalează chiar dacă, din unele motive, o altă secvență este indicată de asemenea ca SEQ ID NO: 2.

Example

În sensul folosit în prezenta, "MFXXXX", unde X reprezintă în mod independent un număr 0-9, se referă la un Fab cuprinzând un domeniu variabil, unde VH are secvența aminoacidică identificată de cele 4 cifre. Dacă nu se indică altceva, regiunea variabilă a lanțului ușor al domeniului variabil are în mod tipic o secvență din Figura 3. Lanțul ușor are o secvență indicată în figura 3. "MFXXXX VH" se referă la secvența aminoacidică a VH identificată de cele 4 cifre. MF mai cuprinde o regiune constantă a unui lanț ușor și o regiune constantă al unui lanț greu care interacționează în mod normal cu o regiune constantă a unui lanț ușor. PG se referă la un anticorp monospecific cuprinzând lanțuri grele și ușoare identice. PB se referă la un anticorp bispecific cu două lanțuri grele diferite. VH / regiunea variabilă a lanțurilor grele diferă și în mod tipic la fel și regiunea CH3, unde unul dintre lanțurile grele are o mutație KK a domeniului său CH3 și celălalt are mutația DE complementară a domeniului său CH3 (vezi ca referință PCT/NL2013/ 050294 (publicată ca WO2013/157954). În PB, PG și alte coduri, indicația numerică este urmată uneori de o indicație a lotului de producție. De exemplu, PB10651p06 se referă la PB10651 lot 6.

Exemplul: 1

Metode, materiale și selecția anticorpilor

Linii celulare:

Celulele Freestyle 293F (cat. nr. p/n51-0029) s-au obținut de la Invitrogen și s-au menținut în mediu 293 FreeStyle. Liniile celulare HEK293T (ATCC-CRL-11268) și CHO-K1 (DSMZ ACC110) au fost achiziționate de la ATCC și menținute în DMEM/F12 (Gibco) suplimentat cu L-Glutamină (Gibco) și FBS (Lonza).

Generarea vectorilor de expresie LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43 recombinanți umani și de șoarece

LGR4 uman (h)LGR4 uman în lungime completă a fost prezent în vectorul pEF1_Myc/His (Invitrogen), conținând 2 motive FLAG și 2 motive HA (pEF1_hLGR4-FLAG-HA) și a fost clonat în pVax1 (Invitrogen), rezultând pVax1_hLGR4-FLAG-HA. Secvența de inserție a fost confirmată prin comparație cu secvența de referință NCBI NM_018490. Secvența a conținut următoarele abateri la nivel aminoacidic: P2A în peptida semnal. Inserția din constructul pEF1_hLGR4-FLAG-HA a fost reclonată în pVax1.

Alternativ, hLGR4 în lungime completă în pVax1 a fost înlocuit cu o versiune trunchiată a hLGR4; hLGR4(ECD)-GPA33(TM)-FLAG, având ca rezultat pVax1_hLGR4(ECD)-GPA33(TM)-FLAG.

Secvența aminoacidică a inserției hLGR4-FLAG-HA în lungime completă (în pEF1_Myc/His și pVax1) pentru expresie pe suprafața celulară

MAGPLGLLCFLALGLLGSAGPSCAAPPLCAAPCSCDGD RRVD C S G K G L T A V P E G L S A F T Q A L D I S M
 NNITQLPEDAFKNFPFLEELQLAGNDLSFIHPKALSGLKELKVLT LQNNQLKTVPSEAIRGLSALQS
 LRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRHLWLDDNSL TEVPVHPLSNLPTLQALTALN KISSIPDFAFTNL
 SSIAYVLHLLIINNKRSL SQHCFDGLDNLETLDLNYNNLGEFPQA I K A L P S L K E L G F T I S N S I S V I P D G A
 FDGNPLLRTHLYDNPLSFVGNSAFHNLSDLHSLVIRGAS MVQQFPNLTGT VHLES L T L T G T K I S S I
 PNNLCQEQKMLRTLDLSYNNIRDLP SFNGCHALEEISLQRNQIYQIKEGTFQGLISLRILDLSRNLI
 HEIHSRAFATLGPI TNLDVSFNELTSFPTEGLNGLNQLKLVGNFKLKEALAAKDFVNLRSLSVPYA
 YQCCAFWGCDSYANLNTEDNSLQDIISVAQEKGTADAANVTSTLENEEHSQHIICTPSTGAFKPCE
 YLLGSWMIRLTVWFIFLV ALFFNLLVILTTFASCTSLPSSKLFIGLISVSNLFMGIYTGILTF L D A V S W
 GRFAEFGIWWETGSGCKVAGFLAVFSSES AIFLLMLATVERSLSAKDIMKNGKSNII L K Q F R V A A L L
 AFLGATVAGCFPLFHRGEYSASPLCLPFPPTGETPSLGFTVTLVLLNSLAFLLMAVIYTKLYCNLEKE
 DLSENSQSSMIKHVAWLIFTNCIFFCPVAFFSFAPLITAISISPEIMKSVTLIFFPLPA CLNPVLYVFF
 NPKFKEDWKLLKRRVTKKSGSVSVSISSQGGCLEQDFYYDCGMYSHLQGNLTVCDCCESFL LTKP
 VSCKHLLIKSHSCPALAVASCQRPEGYWSDCGTQSAHSDYADEEDSFVSDSSDQVQACGRACFYQS
 RGFPLVRYAYNLPRVKDSRDYKDDDDKAGADYKDDDDKLDGGYPYDVPDYAAGAYPYDVPDYA

În care:

MAGPLGLLCFLALGLLGSAGPSGA: peptida semnal

APPLCAAPCSCDGDRLVDCSGKGLTAVPEGLSAFTQALDISMNNITQLPEDAFKNFPFLEELQLAG
 NDLSFIHPKALSGLKELKVLTQLNNQLKTVPSEAIRGLSALQSLRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRH
 IWLDDNSITEVPVHPLSNLPTLQALTLALNKISSIPDFAFTNLSSLVVLHLHNNKIRSLSQHCFDGL
 DNLETLDLNNNLGEFPQAIKALPSLKELGFSNSISVIPDGAFDGNPLLRTHLYDNPLSFVGNLSA
 FIINLSDLHSLVIRGASMVQQFPNLTGTVIILESLLTGTGISSIPNNLCQEQKMLRTLDLSYNNIRD
 LPSFNGCHALEEISLQRNQIYQIKEGTFQGLISLRILDLSRNLIHEIHSRAFATLGPITNLDVSNELT
 SFPTEGLNGLNQLKLVGNFKLKEALAAKDFVNLRSLSVPYAYQCCAFWGCDSYANLNTEDNSLQD
 IISVAQEKGTADAANVTSTLENEEIIISQIIHICTPSTGAFKPCEYLLGSWMIRLTVWFIFLVALFFNLL
 VILTTFASCTSLPSSKLFIGLISVSNLFMGIYTGILTFLDVSWGRFAEFGIWWETGSGCKVAGFLAV
 FSSESAIFLLMLATVERSLSAKDIMKNGKSNHLKQFRVAALLAFLGATVAGCFPLFHRGEYSASPL
 CLPFPTGETPSLGFTVTLVLLNSLAFLLMAYITKLYCNLEKEDLSENSQSSMIKHVAWLIFTNCIF
 FCPVAFFSFAPLITAISISPEIMKSVTLIFFPLPACLNPLYVFFNPVKFKEDWKILKRRVTKKSGSVS
 VSISQGGGLEQDFYYDCGMYSHLQGNLTVCDCCESFLLTKPVSCKHLSHSCPALAVASCQRPE
 GYWSDCGTQSAHSDYADEEDSFVSDSSDQVQACGRACFYQSRGFPLVRYAYNLPRVKD: hLGR4
 (FL)

SR: regiune linker

DYKDDDDK: motiv FLAG

AGA: regiune linker

DYKDDDDK: motiv FLAG

LDGG: regiune linker

YPYDVPDYA: motiv HA

AGA: regiune linker

YPYDVPDYA: motiv HA

Secvența aminoacidică a inserției hLGR4(ECD)-GPA33-FLAG în pVax1 pentru expresie pe suprafața celulară:

MPGPIGLLLCFLALGLLGSAGPSGAAPPLCAAPCSCDGD RRVD CSGKGLTAVPEG
 LSAFTQALDISMNNITQLPEDAFKNFPFLEEELQLAGNDLSFHHPKALSGLKEIK
 VLTILQNNQLKTVPSEAIRGLSALQSLRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRHLWLDD
 NSLTEVPVHPLSNLPTLQALTLALNKISSIPDFAFTNLSSLVVLHLHNNKIRSLS
 QHCFDGLDNLETLDLNNYNNLGEFPQAIKALPSLKELGFSNSISVIPDGAFDGN
 PLLRTIHLVDNPLSFVGNLSAFHNLSDLHSLVIRGASMVQQFPNLTGTVHLESIT
 LTGTKISSIPNNLCQEQKMLRTLDSLNNIRDLPSFNGCHALEEISLQRNQIYQI
 KEGTFQGLISLRILDLNRNLIHEIHSRAFATLGPITNLDVSNELTSFPTGLNGL
 NQLKLVGNFKLKEALAAKDFVNLRSLSVPYAYQCCAFWGCDSYANLNTEDNSL
 QDHSVAQEKGTADAANVTSTLENEEHSQIIHCTPSTGAFKPCEYLLGSWMIR
 VALYVGIAVGVVAALIIHGHYCCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEPPEQLRE
 LSREREEEDDYRQEEQRSTGRES PDHLDQDYKDDDDK

În care:

MPGPIGLLLCFLALGLLGSAGPSGA: peptida semnal

APPLCAAPCSCDGD RRVD CSGKGLTAVPEGLSAFTQALDISMNNITQLPEDAFK
 NFPFLEEELQLAGNDLSFHHPKALSGLKEIKVLTILQNNQLKTVPSEAIRGLSALQ
 SLRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRHLWLDDNSLTEVPVHPLSNLPTLQALTLAL
 NKISSIPDFAFTNLSSLVVLHLHNNKIRSLSQHCFDGLDNLETLDLNNYNNLGEF
 PQAIKALPSLKELGFSNSISVIPDGAFDGNPLLRTIHLVDNPLSFVGNLSAFHNLS
 DLIHSLVIRGASMVQQFPNLTGTVHLESITLTGTKISSIPNNLCQEQKMLRTLDSL
 SYNIRDLPSFNGCHALEEISLQRNQIYQIKEGTFQGLISLRILDLNRNLIHEIHS
 RAFATLGPITNLDVSNELTSFPTGLNGLNQLKLVGNFKLKEALAAKDFVNL
 RLSVPYAYQCCAFWGCDSYANLNTEDNSLQDHSVAQEKGTADAANVTSTLENEE
 HSQIIHCTPSTGAFKPCEYLLGSWMIR: hLGR4(ECD)
 VALYVGIAVGVVAALIIHGHYCCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEPPEQLRE
 LSREREEEDDYRQEEQRSTGRES PDHLDQ: secvența GPA33 conținând regiunea TM
 region

DYKDDDDK: FLAG

LGR5 uman

(h)LGR5 uman în lungime completă a fost prezent în vectorul pEF1_Myc/His (pEF1_hLGR5-FLAG-HA), conținând 2 motive FLAG și 2 motive HA, și a fost clonat în pVax1 (Invitrogen), având ca rezultat pVax1_hLGR5-FLAG-HA. Secvența de inserție a fost confirmată prin comparație cu secvența de referință NCBI NM_003667.3. Inserția din constructul pEF1_hLGR5-FLAG-HA a fost reclonată în pVax1, având ca rezultat pVax1_hLGR5-FLAG-HA. Alternativ, hLGR5 în lungime completă în pVax1 a fost înlocuit

cu o versiune trunchiată a hLGR5; hLGR5(ECD)-GPA33(TM)-FLAG, având ca rezultat pVax1_hLGR5(ECD)-GPA33(TM)-FLAG.

Secvența aminoacidică a inserției hLGR5-FLAG-HA în lungime completă (în pEF1_Myc/His și pVax1) pentru expresie pe suprafața celulară

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMIJRVDCSDLGISELPSNLSV
FTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKGAFTGLYSLKVLMLQNNQLRHVPTE

ALQNLRLSLRLDANHISYVPPSCFSGLHSLRHLWLDDNALTEIPVQAFRSLALQAMTLALNKI
IIHHPDYAFGNLSSIVLJHLHNNRIHSLGKKCFDGLHSIETLDINYNLDEFPTAIRTLNLIKELGF
IISNNIRSIPEKAFVGNPSLIHIFYDNPIQFVGRSAFQIILPELRTITLNGASQITEFPDITGTANLES
LTLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLS
LRSLNLAWNKLAIHHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSFPITGLHGLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPEL
KVIEMPYAYQCCAFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLDFEE
DLKALHSVQCSPSPGPFKPCIEILLDGLIRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLYISPIKLLIGVIA
AVNMLTGVSASVLAGVDAFTFGSFARIIGAWWENGVGCIHIGFLSIFASESSVFLTLAALERGFS
KYSAKFETKAPFSSLKVIILLCALLALTMAAVPLLGGSKYGASPLCLPLPFGEPSTMGYMVALILLN
SLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGDLENIWDCSMVKHIALLLFTNCILNCPVAFLSFSSLINLTFISPEVI
KFILLVVVPLPACLNPLLYILFNPIIFKEDLVSLRKQTYVWTRSKIIPSLMSINSDDVEKQSCDSTQAL
VTFTSSSITYDLPPSSVPSPAYPVTESCHLSSVAFVPCLARDYKDDDDKAGADYKDDDDKLDGGYP
YDVDPDYAAGAYPYDVDPDYA

În care:

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATG: peptida semnal

GSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMILLRVDCSDLGLSELPSNLSVFVTSYLDLSMNNISQLLPNPLP
 SLRFLFEEIRLAGNALTYIPKGAFTGLYSIKVLMILQNNQLRHVPTEALQNLRSIQSLRLDANHSYV
 PPSCFSGLHSLRHLWLDDNALTEIPVQAFRSLSALQAMTLALNKIHIIIPDYAFGNLSSIVVLIHIIIN
 NRIHSLGKKCFDGLHSLETLDLNYNNLDEFPTAIRTLNLKEIGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITI
 IIFYDNPIQFVGRSAFQILPELRTLTNGASQITEFPDLTGTANLESLLTGAQISSLPQTVCNQLPN
 LQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKKIAIHPNAFSTL
 PSLIKLDLSSNLLSSFPITGLIHGLTHIKITGNHIALQSLISSENFPEIKVIEMPYAYQCCAFGVCENA
 YKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLLDFEEDLKALHSVQCSPSPGPFKPC
 HLLDGWLRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLYISPIKLLIGVIAAVNMLTGVSSAVLAGVDAFT
 FGSFARHGAWWENGVCCHVIGFLSIFASESSVFLLTLAALERGFSKYSKAFETKAPFSSLKVIILL
 CALLALTMAAVPLLGGSKYGASPLCLPLPFGEPTMGYMVALILLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDK
 GDLENIWDCSMVKHIALLLFTNCILNCPVAFLSFSSLINLTFISPEVIKFILLVVVPLPACLNPLLYIL
 FNPHEKEDLVSLRKQTYVWTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVTFITSSSITYDLPPSSVPSA
 YPVTESCHLSSVAFVPCL: hLGR5

AR: regiune linker

DYKDDDDK: motiv FLAG

AGA: regiune linker

DYKDDDDK: motiv FLAG

LDGG:1 regiune linker

YPYDVPDYA: motiv HA

AGA: regiune linker

YPYDVPDYA: motiv HA

Secvența aminoacidică a inserției hLGR5(ECD)-GPA33(TM)-FLAG în pVax1 pentru expresie pe suprafața celulară:

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCS
 DLGLSELPSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKG
 AFTGLYSLKVLMLQNNQLRHVPTEALQNLRSLSRLDANHISYVPPSCFSGLH
 SLRIILWLDDNALTEIPVQAFRSLSALQAMTLALNKIIHHPDYAFGNLSSLVVLH
 LHNNRIHSLGKKCFDGLHSLETLDLNYNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIR
 SIPEKAFVGNPSLITHFYDNPIQFVGRSAFQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTG
 TANLESITLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDL
 RHNEIYEIKVDTFQQLLSLRSNLAWNKIAHHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSF
 PITGLHGLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPYAYQCCAFGVCENAYKIS
 NQWNKGDNSSMDDLIHKDAGMFQAQDERDLEDFLDFFEDLKALHSVQCSP
 SPGPFPKCEHLLDGWLIRVALYVGIAVGVAALIIHGHYCCCCRGKDDNTEDKE
 DARPNREAYEPEPEQLRELSREREEEDDYRQEEQRSTGRES PDHLDQDYKDDD
 DK

În care:

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATG: peptida semnal
 GSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDI GLSELPSNLSVFTSYLDLSM
 NNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKG AFTGLYSLKVLMLQNNQLRHV
 PTEALQNLRSLSRLDANHISYVPPSCFSGLHSLRIILWLDDNALTEIPVQAFR
 SLSALQAMTLALNKIIHHPDYAFGNLSSLVVLH LHNNRIHSLGKKCFDGLHSLE
 TLDLNYNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITHFYDNPI
 QFVGRSAFQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTG TANLESITLTGAQISSLPQTV
 CNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLLSLRS
 NLAWNKIAHHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSF PITGLHGLTHLKLGTGNHALQSL
 ISSENFPELKVIEMPYAYQCCAFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLIHKDAG
 MFQAQDERDLEDFLDFFEDLKALHSVQCSPSPGPFPKCEHLLDGWLIR:
 hLGR5 (ECD)
 VALYVGIAVGVAALIIHGHYCCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEPEPEQLRE
 LSREREEEDDYRQEEQRSTGRES PDHLDQ: secvența GPA33 conținând regiunea TM
 region
 DYKDDDDK: FLAG

LGR5 murin

cADN care codifică (m)LGR5 murin în lungime completă (FL) a fost prezent în pEF1_Myc/His (Invitrogen), conținând un motiv cMyc și un motiv HIS (pEF1_mLgr5-Myc-HIS). Secvența cADN mLgr5 a fost confirmată prin secvențiere și comparație cu secvența de referință NCBI NM_010195.2.

Secvența aminoacidică a inserției (m)Lgr5-Myc-HIS murin în lungime completă în pEF1_Myc/His pentru expresie pe suprafața celulară

MDTSCVHMLLSLLALLQLVAAGSSPGPDAIPRGCPHCHCELDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSV
 FTSYLDLSMNNISQLPASLLIIRLCFLEELRLAGNALTHIPKGAFTGLHSLKVLMLQNNQLRQVPEE
 ALQNLRLSLQSLRLDANHISYVPPSCFSGHLHLRLWDDNALTDVPVQAFRSLALQAMTLALNKI
 IIIIADYAFGNLSSLVVLIHLINNRHISLGGKCFDGLHISLETLDLNNYNNLDEFPTAIKTLNLKELGF
 IISNNIRSIPERAFVGNPSLITIHFYDNPIQFVGVSFAQHILPELRTITLNGASHITEFPPIITGTATLES
 I/TLTGAKISSLPQAVCDQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSLSGCQKLQKIDLRHNEIYEIKGSTFQQLFN
 LRLSLNLAWNKLAIHPNAPSTLPSLIKLDLSSNLLSSFPVTGLHGLTHLKLGTGNRALQSLIPSANFPE
 LKIIEMPSAYQCCAFGGCENVYKISNQWNKDDGNSVDDLHKKDAGLFQVQDERDLEDFLLDFEE
 DLKALHSVQCSPSPGPFKPCCEHLFGSWLIRIGVWTTAVLALSCNALVALTVFRTPLYISSIKLLIGVI
 AVVDILMGVSSAVLAAVDAFTFGRFAQHGAWWEDGIGCQIVGFLSIFASESSIFLLTLAALERGEFSV
 KCSSKFEVKAPLPSLRAIVLLCVLLALTIATIPLLGGSKYNASPLCLPLPFGEPTTGYMVALVLLNS
 LCFLIMTIATYTKLYCSLEKGELENLWDCSMVKHIALLLFANCILYCPVAFLSFSSLLNLTFISPDVIK
 FILLVIVPLPSCNLPLIYVFNPHFKEDMGSLGKHTRFWMRKSHASLLSINSDDVEKRSCESTQALV
 SFTHASIAVDLPSTSGASPAYPMTESCHLSSVAFVPCIAAARGHPFEQKLISEEDLNMHGTGIIIIIIH
 H

În care:

MDTSCVHMLLSLLALLQLVAA **peptida semnal**
 GSSPGPDAIPRGCPHCHCELDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSVFTSYLDLSMNNISQLPASLLI
 RLCLFLEELRLAGNALTHIPKGAFTGLHSLKVLMLQNNQLRQVPEEALQNLRLSLQSLRLDANHISYV
 PPSCFSGHLHLRLWDDNALTDVPVQAFRSLALQAMTLALNKIIIIADYAFGNLSSLVVLIHLIN
 NRHISLGGKCFDGLHISLETLDLNNYNNLDEFPTAIKTLNLKELGFHISNNIRSIPERAFVGNPSLIT
 HFYDNPIQFVGVSFAQHILPELRTITLNGASHITEFPPIITGTATLESITLTGAKISSLPQAVCDQLPN
 LQVLDLSYNLLEDLPSLSGCQKLQKIDLRHNEIYEIKGSTFQQLFNLRSLNLAWNKLAIHPNAPST
 LPSLIKLDLSSNLLSSFPVTGLHGLTHLKLGTGNRALQSLIPSANFPELKIIEMPSAYQCCAFGGCENV
 YKISNQWNKDDGNSVDDLHKKDAGLFQVQDERDLEDFLLDFEEDLKALHSVQCSPSPGPFKPCCE
 HLFGSWLIRIGVWTTAVLALSCNALVALTVFRTPLYISSIKLLIGVI
 AVVDILMGVSSAVLAAVDAFTFGRFAQHGAWWEDGIGCQIVGFLSIFASESSIFLLTLAALERGEFSV
 KCSSKFEVKAPLPSLRAIVLLCVLLALTIATIPLLGGSKYNASPLCLPLPFGEPTTGYMVALVLLNS
 LCFLIMTIATYTKLYCSLEKGELENLWDCSMVKHIALLLFANCILYCPVAFLSFSSLLNLTFISPDVIK
 FILLVIVPLPSCNLPLIYVFNPHFKEDMGSLGKHTRFWMRKSHASLLSINSDDVEKRSCESTQALV
 SFTHASIAVDLPSTSGASPAYPMTESCHLSSVAFVPCIAAARGHPFEQKLISEEDLNMHGTGIIIIIIH
 H
 AAARCHPF: **linker**
 EQKLISEEDL: **motiv de epitop derivat din cMyc**
 NMHTG: **linker**
 IIIIIIIIIH: **motiv Hexa His**

Clonarea cADN care codifică ZNRF3 uman

cADN care codifică (h)ZNRF3 uman (Genbank NM_001206998.1) s-a folosit ca matriță pentru amplificarea părților specifice ale cADN (domeniul extracelular (ECD): aminoacizi 1 - 219, sau partea ECD-TM (mutant de trunchiere): aminoacizi 1 - 256). Pentru a putea exprima proteina țintă pe suprafața celulelor antigen-negative și pentru a putea genera clone celulare stabile, cADN care codifică ECD al hZNRF3 a fost clonat în pDisplay (pDisplay_hZNRF3(ECD)-cMyc-PDGFR(TM)) și un mutant de trunchiere (ECD cu regiunea TM autologă) a fost clonat în pcDNA3.1 (pcDNA3.1_hZNRF3(ECD-TM)). Constructul pDisplay permite confirmarea expresiei de suprafață proteică printr-un motiv de epitop derivat din cMyc extracelular. Primerii specifici au fost proiectați, sintetizați și folosiți pentru amplificarea părților specifice ale hZNRF3. Aceștia s-au clonat apoi în pDisplay (numai ECD), având ca rezultat pDisplay_hZNRF3(ECD)-cMyc-PDGFR(TM) și în pcDNA3.1 (ECD cu regiune TM), având ca rezultat pcDNA3.1_hZNRF3(ECD-TM) pentru expresie în celule (antigen-negative).

Clonarea cADN care codifică ZNRF3 ECD murin și RNF43 ECD uman și producerea proteinei recombinante

cADN-urile care codifică ECD al (m)ZNRF3 murin (Genbank NM_001080924.2, aminoacizi 53-205, peptida semnal folosită s-a obținut din cistatin) și ECD al RNF43 uman (GenBank NM_017763, aminoacizi 24-109, conținând secvența lider cistatin) s-au folosit pentru a genera proteine recombinante purificate, cu motiv his, constând din ECD ale țintelor, în vector pUPE (U-Protein Express BV). Pe scurt: constructele (Peng et al. 2013 Plos ONE 8:2-10) s-au transfectat în celule Hek293E (293 c18 ATCC, CRL-10852) și, după o săptămână de producție, s-a recoltat supernatantul conținând proteina. Proteinele cu motiv hexa HIS s-au purificat prin IMAC (cromatografie de afinitate cu ioni de metal imobilizați) și filtrare în gel. Un alt cADN care codifică ECD (optimizat cu codoni) al ZNRF3 murin a fost realizat sintetic și clonat în cadru cu un motiv de epitop derivat din cMyc și regiunea transmembranară a receptorului factorului de creștere derivat din trombocite (PDGFR) în pDisplay pentru expresie pe suprafața celulară (pDisplay_mZnrf3-cMyc-PDGFR(TM)).

Clonarea cADN care codifică RNF43 uman

cADN care codifică (h)RNF43 uman (GenBank NM_017763) s-a folosit ca matriță pentru amplificarea părților specifice ale cADN (domeniul extracelular (ECD): aminoacizi 1 -

199, sau partea ECD-TM (mutant de trunchiere): aminoacizi 1 - 222). Pentru a putea exprima proteina țintă pe suprafața celulelor antigen-negative și pentru a putea genera clone celulare stabile, cADN care codifică ECD al hRNF43 a fost clonat în pDisplay (pDisplay_hRNF43(ECD)-cMyc-PDGFR(TM)) și un mutant de trunchiere al hRNF43 (ECD cu regiunea TM autologă) a fost clonat în pcDNA3.1 (pcDNA3.1_hRNF43(ECD-TM)). Constructul pDisplay permite confirmarea expresiei de suprafață proteică printr-un motiv de epitop derivat din cMyc extracelular. Primerii specifici au fost proiectați, sintetizați și folosiți pentru amplificarea părților specifice ale hZNR3. Aceștia s-au clonat apoi în pDisplay (numai ECD, în scop de imunizare) și în pcDNA3.1 (ECD cu regiune TM) pentru expresie în celule (antigen-negative) și generarea clonelor celulare care exprimă stabil ținta.

Clonarea cADN care codifică RNF43 murin

cADN care codifică ECD al (m)RNF43 murin (Genbank NM_172448.3, aminoacizi 1-199) a fost ordonat ca o genă sintetică și a fost clonat în cadru cu un motiv de epitop derivat din cMyc și regiunea transmembranară a receptorului factorului de creștere derivat din trombocite (PDGFR) în pDisplay pentru expresie pe suprafața celulară pDisplay_mRnf43-cMyc- PDGFR(TM).

ZNR3(ECD) uman în secvența aminoacidică pDisplay pentru expresie pe suprafața celulară:

```
MRPRSGGRPGATGRRRRRLRRRPRGLRCSRLPPPPPLPLLLGLLLAAGPGAAR
AKETAFVEVVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMIPLGLCN
NNDEEDLYEYGWVGVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSEN
PEAIDQINQSEDLKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQIRPPRQPTIE
YFDMVDEQKLISEEDLNAVGGDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTHSLIIL
IMLWQKKPR
```

În care:

```
MRPRSGGRPGATGRRRRRLRRRPRGLRCSRLPPPPPLPLLLGLLLAAGPGAAR
```

A: peptida semnal

KETAFVEVVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMHPLGLCNN
 NDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENP
 EADQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHRPPRQPTEY
 FDM:

ECD al ZNRF3 VD uman: aminoacizi codificați de situsuri de clonare

EQKLISEEDL: motiv de epitop derivat din cMyc

NAVGGDTQEVIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR:

secvența PDGFR conținând regiunea TM

Secvența aminoacidică a mutantului de trunchiere ZNRF3 uman pentru expresie pe suprafața celulară:

MRPRSGRPGATGRRRRRLRRRPRGLRCSRLPPPPPLPLLLGLLLAAAGPGAAR
 AKETAFVEVVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMIPLGLCN
 NNDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENP
 PEADQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHRPPRQPTE
 YFDMGIFLAFFVVVSLVCLILLVKIKLKQRRSQNSMNRPAV

În care:

MRPRSGRPGATGRRRRRLRRRPRGLRCSRLPPPPPLPLLLGLLLAAAGPGAAR

A : peptida semnal

KETAFVEVVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMHPLGLCNN
 NDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENP
 EADQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHRPPRQPTEY
 FD: ECD al ZNRF3 uman

MGIFLAFFVVVSLV : regiune TM anticipată

CLILLVKIKLKQRRSQNSMNRPAV: coadă intracelulară

ZNRF3 murin ECD-His în secvența aminoacidică pUPE solubilă pentru expresia proteinei solubile:

GSKETAFVEVVLFESSPSGDYTTHTTGLTGRFSRAGAMLSAEGEIVQMHPLGLC
 NNNDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSE
 NPEADQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHIAAAHH
 HHHH

În care:

GS : aminoacizi codificați de situsuri de clonare

KETAFVEVVLFESSPSGDYTTHTTGLTGRFSRAGAMLSAEGEIVQMHPLGLCN
 NNDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSEN
 PEAIQQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQIIL: ECD of

mouse / ECD al ZNRF3 murin

AAA : aminoacizi codificați de situsuri de clonare

HHHHHH : motiv Hexa His

Secvența (m)ZNRF3 murin în secvența aminoacidică pDisplay exprimată pe suprafața celulară:

MRPRSGRPGAPGRRRRRLRRGPRGRRLPPPPPLPLLGLLLAAAGPGAARAKE
 TAFVEVVLFESSPSGDYTTHTTGLTGRFSRAGAMLSAEGEIVQMHPLGLCINN
 DEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENPE
 AIDQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQIILPPRPTEYF
 DMVDEQKLISEEDLNAVGGDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIM
 LWQKKPR

În care:

MRPRSGRPGAPGRRRRRLRRGPRGRRLPPPPPLPLLGLLLAAAGPGAARA: peptida semnal

KETAFVEVVLFESSPSGDYTTHTTGLTGRFSRAGAMLSAEGEIVQMHPLGLCN
 NNDEEDLYEYGWVG VVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSEN
 PEAIQQLNQGSSEDPKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHLP RPQTE
 YFDM: ECD mZNRF3

VD: aminoacizi codificați de situsuri de clonare

EQKLISEEDL: motiv de epitop derivat din cMyc

NAVGGDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR:

secvența PDGFR conținând regiunea TM

RNF43 uman în secvența aminoacidică pDisplay pentru expresie pe suprafața celulară:

MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRTGLVLAAAVESERSAEQKAIIRVIPL
 KMDPTGKLNLTLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFISIV
 KLESPRRAPRPCSLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQLQQPLGLTWPV
 VLIWGNDAEKLMFVYKNQKAHVRIELKEPPAWPDYDVVDEQKLISEEDLNAV
 GQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

În care :

MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRTGLVLAAAVESERSA : : peptida semnal

EQKAIIRVIPLKMDPTGKLNLTLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDD
 DNLEPGFISIVKLESPRRAPRPCSLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQL
 QQPLGLTWPVVLIWGNDAEKLMFVYKNQKAHVRIELKEPPAWPDYDV: ECD

ECD al RNF43 uman

VD : aminoacizi codificați de situsuri de clonare

EQKLISEEDL : motiv de epitop derivat din Myc

NAVGGDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR : PDGFR
 secvența PDGFR conținând regiunea TM

RNF43 murin în secvența aminoacidică pDisplay pentru expresie pe suprafața celulară

MSGGHQLQLAVLWPWLLMATLHAGFGHTGRVLAAAVESERSAEQKAVIRVIPL
 KMDPTGKLNLTLEGVFAGVAEVTPEAGKLMQSHPLYLCNASDDDNLEPGFISI
 VKLESPRRAPRPCSLASKARMAGERGANAVLFDITEDRSAAEQQLQPLGLTKP
 VVLIWGSDAAKLMFVYKNRKAYVWIELKEPPAGANYDVVDEQKLISEEDLNA
 VGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

În care:

MSGGHQLQLAVLWPWLLMATLHAGFGHTGRVLAAAVESERSA : peptida semnal

EQKAVIRVIPLKMDPTGKLNLTLEGVFAGVAEVTPEAGKLMQSHPLYLCNASD
 DDNLEPGFISIVKLESPRRAPRPCSLASKARMAGERGANAVLFDITEDRSAAEQ
 LQQPLGLTKPVVLIWGSDAAKLMFVYKNRKAYVWIELKEPPAGANYDV: ECD

ECD al RNF43 murin

VD: aminoacizi codificați de situs de clonare

EQKLISEEDL: motiv de epitop derivat din Myc

NAVGGDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR: PDGFR
 : secvența PDGFR conținând regiunea TM

Clonarea ortologilor de macac și șobolan ai LGR5 și EGFR

cADN care codifică LGR5 de macac a fost amplificat din cADN din colon și ficat de macac folosind primeri specifici umani (Cyno-LGR5-FOR:

5'-CCAGCAGGATCCGCCGCCACCATGGACACCTCCCGGCTCGGTG-3' și

Cyno-LGR5-REV:

5'- CCAGCAGCGGCCGCTTAGAGACATGGGACAAATGCCAC-3').

S-a adăugat DMSO în reacție pentru a îmbunătăți randamentul și specificitatea reacțiilor PCR. cADN din colon și ficat a permis amplificarea benzii 2.7kb anticipate și produsul PCR obținut din cADN de colon s-a folosit pentru clonare. cADN obținut a fost clonat în pcDNA3.1 (*BamH1-Not1*) și secvențiat. Secvența care codifică un receptor EGF himeric alcătuit din domeniul extracelular de macac (descriș și în WO2010/022736-A2) cuplat cu partea transmembranară și intracelulară umană s-a obținut din brevetul US2010/0183615-A1 (pagina 79) și cADN codicator a fost optimizat cu codoni pentru expresie în celule umane, ordonat și clonat de GeneArt. Acest cADN s-a reclonat apoi în pcDNA3.1 folosind *Nhe1* și *Not1*. cADN-urile care codifică EGFR de șobolan și LGR5 de șobolan sunt disponibile prin Sino Biological (cADN care codifică EGFR de șobolan: cat. nr. RG80100-UT; referință GenBank HM801041.1) și Origene (cADN care codifică LGR5 de șobolan: cat. nr. RN202738; referință GenBank NM_001106784). Ambele cADN-uri s-au reclonat în pcDNA3.1 folosind *Kpn1* și *Not1*. Toate cADN-urile au fost secvențiate și indicate ca fiind corecte.

Secvența aminoacidică a LGR5 wt de macac în lungime completă

MDTSRLGVLLSLPVLLQLAAGSSSPRSGALLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSD
LGLSELPSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGA
FTGLYSLKVLMLQNNQLRQVPTEALQNLRLSLRLDANIHSYVPPSCFSGLIIS
LRHLWLDNLAITEIPVQAFRSLALQAMTLALNKHHPDYAFGNLSSLVVLHL
HNNRIHSLGKKCFDGLHSLETLDLNYYNNLDEFPTAIRTLNLKEIGFHSNNIRS
IPEKAFVGNPSLITIHIFYDNPIQFVGRSAFQHLPFLRTLTNGASQITEFPDITGT
ANLESITLTGAQISSLPQTVCNQLPNIQVLDLSYNIJEDLPSFSVCQKIQKIDLR
HNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKIAIHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSFP
VTGLHGLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPELKIEMPYAYQCCAFGVCENAYKIS

NQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQVQDERDLEDFLDFEEDLKALHSVQCSP
SPGPFKPCIEILLDGWLIRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLYISPIKLLIGVIA
VVMNLTGVSSAVLAGVDAFTFGSFARIIGAWWENGVCQVIGFLSIFASESSVFL
LTLAALERGFVSKCSAKFETKAPFSSSLKVILLCALLALTMAAVPLLGGSEYGAS
PLCLPLPFGEPSTTGYMVALILLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGDLENIWDCS
MVKIHAILLLFTNCHLYCPVAFISFSSLLNLTFFISPEVIKFIILLVIVPLPACINPLLYI
LFNPHFKEDLVSLGKQTYFWTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVTFTSSS
IAYDLPPSSVPSPAYPVTESCIISSVAFVPCI

În care:

MDTSRLGVLLSLPVLLQLAAG peptida semnal

SSSPRSGALLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSVFTSYLDLSM
 NNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKGAFGLYSLKVLMLQNNQLRQV
 PTEALQNLRLSLQSLRLDANHISYVPPSCFSGHSLRHLWLDDNALTEIPVQAFR
 SLSALQAMTLALNKHIIIPDYAFGNLSSLVVLIIILINNRIISLGKKCFDGLIISLE
 TLDLNYNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLTIHFYDNPI
 QFVGRSAFQIILPELRTLTLNGASQITEFPDLTGANLESLLTGAQISSLPQTVC
 NQLPNLQVLDLSYNLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSL
 NLAWNKHIAIHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLISSFPVTGLHGLTHLKLITGNHALQS
 LISSENFPELKIIEMPYAYQCCAFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDA
 GMFQVQDERDLEDFLIDFEEDLKAHLSVQCSPSPGPFKPCHELIIDGWILIRIGV
 WTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLIYISPIKLLIGVIAVVNMLTGVSSAVLAGVDAFT
 FGSFARHGAWWENGVCQVIGFLSIFASESSVFLTLAALERGFSVKCSAKFET
 KAPFSSLKVIILLCALLALMAAVPLLGCSEYGASPLCLPLPFGEPTTCYMGVALI
 LLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGDLENIWDCSMVKHIALLLFTNCILYCPVAF
 LSFSSLLNLTFISPEVIKFILLVIVPLPACLNPLLYILFNPIHFKEIDLVS LGKQTYFW
 TRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVTFTSSSIAYDLPPSSVPSPAYPVTESE
 ILLSSVAFVPCL LGR5 de macac

Generarea liniilor celulare care supraexprimă LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43

Constructele care exprimă hLGR4 (pEF1_hLGR4-FLAG-HA), hLGR5 (pEF1_hLGR5-FLAG-HA), hZNRF3(ECD) (pcDNA3.1_hZNRF3(ECD) și pDisplay_hZNRF3(ECD)-Myc-PDGFR(TM)) și hRNF43(ECD) (pDisplay_hRNF43-(ECD)-Myc-PDGFR(TM)) s-au folosit pentru a genera clone Freestyle 293F și CHO-K1 care exprimă stabil proteinele respective. Constructele au fost transfectate temporar în celule Freestyle 293F și CHO-K1 folosind transfecție cu PEI (celule Freestyle 293F) sau lipofectamina (celule CHO) și selectate prin FACS folosind anticorpi care reacționează cu țintele. După transfecția reușită, celulele Freestyle 293F și CHO-K1 au fost însămânțate în diluție limitativă și cultivată în 0.5 mg/ml G418 pentru a obține clone celulare stabile. După 2-3 săptămâni de selecție, clonele au fost analizate prin FACS. Clonele selectate au fost amplificate prin însămânțare în serie, retestate în FACS și congelate la -150°C.

Șoareci folosiți pentru imunizare

Pentru generarea anticorpilor umani care se leagă de LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43, șoarecii transgenici pentru lanțul ușor VK1-39 uman (șoareci cu lanț ușor comun, vezi WO2009/157771) și pentru un minilocus al lanțului greu uman (HC) (cuprinzând o selecție de segmente genice V umane, toate D umane și toate J umane) au fost imunizați cu ADN care codifică proteinele sau ADN recombinant așa cum se descrie pe scurt mai jos. Acești șoareci sunt denumiți șoareci 'MeMo®'.

Imunizări

Imunizări cu ADN hLGR4/hLGR5

18 șoareci au fost imunizați cu 20 µg ADN plasmidic (pVax1_hLGR4-FLAG-HA și pVax1_hLGR5-FLAG-HA) care exprimă hLGR4 și hLGR5 în lungime completă. În plus, 12 șoareci au fost imunizați cu 20 µg ADN plasmidic din domeniul extracelular al hLGR4 și hLGR5 fuzionat cu domeniul transmembranar al GPA33 și un motiv Flag (pVax1_hLGR4(ECD)-GPA33-FLAG și pVax1_hLGR5(ECD)-GPA33-FLAG). Șoarecii au fost vaccinați în ziua 0, 3, 6, 14, 17, 28, 31, 49, 63, 70, 84 și 91.

Imunizări cu proteine LGR4, LGR5, ZNRF3, RNF43

Şase șoareci au fost imunizați cu 40 µg proteină (rh)LGR4-Fc recombinant uman (RND systems nr. cat. 7750-GP), rhLGR5-Fc (RND systems nr. cat. 8078-GP), rhZNRF3-Fc (RND systems nr. cat. 7994-RF) sau rhRNF43-Fc (RND systems nr. cat. 7964-RN) dizolvată în PBS și suplimentată cu 40 µl adjuvant Gerbu MM (Gerbu Biotechnik). Șoarecii au primit apoi doze suplimentare de 20 µg proteină recombinantă (+ 20 µl adjuvant Gerbu MM) în ziua 14 și ziua 28, urmate de alte doze suplimentare de 20 µg proteină recombinantă până când s-a observat un titru seric sau perioada de imunizare a fost mai mare de trei luni.

Determinarea titrelor de anticorp

S-au determinat titrele anti-hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43 în ser de la șoareci imunizați prin FACS pe celule Freestyle 293F care supraexprimă ținta respectivă.

Recuperarea țesutului limfoid

S-au îndepărtat splina și ganglionii limfatici de drenaj de la toți șoarecii imunizați cu succes (vezi tabelul 1). Suspensiile de celule individuale s-au generat din splină și ganglionii limfatici inghinali, după care aceste țesuturi au fost lizate în reactiv Trizol și congelate la -80°C până la utilizare.

Generarea repertoriilor de anticorpi fagici 'imuni' prin clonarea RT-PCR a genelor VH

De la șoarecii imunizați cu succes s-au folosit ganglionii limfatici inghinali pentru realizarea repertoriilor de anticorpi fagici 'imuni'. ARN s-a extras din țesutul limfoid folosind Trizol și s-a folosit 1µg de ARN total într-o reacție RT folosind un primer specific pentru IgG-CH1. cADN rezultat s-a folosit pentru amplificarea grupului policlonal al cADN care codifică VH folosind primeri VH-specfici dezvoltăți intern în esență așa cum se descrie în Marks et al.

(J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97). Produsul PCR rezultat a fost clonat apoi într-un vector fagemid pentru prezentarea fragmentelor Fab pe fag, așa cum se descrie în de Haard et al. (J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30) cu excepția faptului că lanțul ușor a fost identic pentru fiecare anticorp și codificat de vector. După ligare, fagemidele s-au folosit pentru a transforma bacteriile *E.coli* TG1 și bacteriile transformate au fost așezate pe plăci de LB-agar conținând ampicilină și glucoză. Toate bibliotecile de fagi au conținut $>10^6$ transformanți și au avut o frecvență de inserție $> 80\%$. Bacteriile au fost recoltate după creștere peste noapte și folosite pentru prepararea fagului conform protocoalelor cunoscute (de Haard et al., J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30).

Selecția fragmentelor Fab purtătoare de fagi care se leagă specific de LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43 din repertorii de anticorpi sintetici sau fagici 'imuni'

Bibliotecile de fagi au fost recuperate conform procedurilor standardizate (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30) și fagii s-au selectat în două runde de selecție în cazul repertoriilor sintetice generate intern și o singură rundă în cazul repertoriilor de anticorpi fagici imuni. În prima rundă, proteina recombinantă a fost aplicată pe godeurile unei plăci MAXISORP™ ELISA sau într-un imunotub NUNC, în timp ce în a doua rundă s-au folosit proteina recombinantă sau celule care supraexprimă ținta. Plăcile ELISA MAXISORP™ sau imunotuburile au fost blocate cu 4% ELK. Bibliotecile de anticorpi fagici au fost de asemenea blocate cu 4% ELK și surplus de IgG uman pentru depleția lianților regiunii Fc înainte de adăugarea bibliotecii de fagi în antigen.

Incubarea cu biblioteca de fagi cu proteina aplicată s-a efectuat 2 h la temperatura camerei în condiții de agitare. Plăcile sau tuburile au fost spălate de cinci până la de zece ori cu 0.05% Tween-20 în PBS, urmată de spălare de 5 până la de 10 ori cu PBS. Fagii legați au fost eluați folosind 50mM glicină (pH 2.2) și s-au adăugat în *E. coli* TG-1 și s-au incubat la 37°C pentru infecția fagilor. Bacteriile infectate au fost așezate în plăci de agar conținând ampicilină și glucoză și incubate la 37°C peste noapte. După prima rundă de selecție, coloniile s-au desprins de pe plăci, s-au combinat, după care au fost recuperate și amplificate pentru prepararea unui prim grup de fagi din prima rundă îmbogățiti pentru repertoriile sintetice. Pentru repertoriile 'immune', s-au selectat clone individuale cu privire la legarea țintei după prima rundă de selecție a fagilor.

Pentru repertoriile sintetice, biblioteca îmbogățită a fost selectată pe proteina umană recombinantă (rh) (rhLGR4-Fc, rmLgr4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc, RND

systems, rhRNF-43-HIS solubilă, rmZnrf3-HIS (produsă intern)) folosind protocolul descris mai sus sau pe celule Freestyle 293F care supraexprimă stabil hLGR4(FL), hLGR5(FL), hZNRF3(ECD) sau hRNF43(ECD). Pentru selecțiile celulare, fagii recuperați și celulele s-au blocat cu 4% ELK. După blocare, fagii recuperați au fost incubati cu 5×10^6 celule mamă Freestyle 293F pentru scădere 1h. După scădere, celulele au fost centrifugate și supernatantul fagic s-a transferat în celule Freestyle 293F care exprimă hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43. Celulele și fagii s-au incubat 2 h la 2-8°C. Spălarea celulelor (5-10 ori) s-a efectuat folosind 5ml de 0.5% BSA în PBS. Fagii legați au fost eluați folosind 200mM TEA, eluatul a fost neutralizat cu Tris (pH8) și adăugat în *E. coli* TG-1 și incubat la 37°C pentru infecția fagilor. Bacteriile infectate de fagi au fost așezate în plăci de agar conținând ampicilină și glucoză și incubate la 30°C sau 37°C peste noapte.

După a doua rundă de selecție, clonele individuale au fost colectate și testate cu privire la reactivitatea țintei. Clonele fagice pozitive care leagă hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43 au fost identificate în FACS pentru legare de Freestyle 293F care supraexprimă stabil ținta respectivă (vezi mai jos).

Marcarea DiD a celulelor și colorarea FACS a unui amestec de celule DiD-pozitive și negative

Clonele celulare Freestyle 293F care supraexprimă stabil țintele au fost generate intern. Aceste celule au fost cultivate și recoltate prin proceduri standardizate. Aproximativ 20 de milioane de celule care exprimă antigen au fost marcate cu 1μl de DiD (Invitrogen, nr. cat. V22889) într-un volum de 1ml de mediu de cultură celulară, 20 de minute la 37°C. Marcarea DiD a fost verificată pe o parte alicotă mică de celule în FACS și s-a constatat că este mai mare de 90%. Celulele au fost spălate de două ori cu 20ml de mediu de cultură celulară, după care s-au folosit pentru colorarea FACS. În acest scop, s-a preparat un amestec 1:1 de celule Freestyle 293F antigen-negative (mamă) și celule antigen-pozitive marcate cu DiD și s-a împărțit în părți alicote de 200.000 celule per godeu în plăci de microtitru FACS cu 96 de godeuri cu fund rotund. Colorarea folosind fagi monoclonali s-a efectuat așa cum se descrie mai jos.

Colorarea FACS a unui amestec de celule pozitive și negative pentru țintă folosind fagi monoclonali

Fagii monoclonali ai clonelor individuale selectate pentru legarea țintelor s-au preparat conform descrierii (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30). Aceștia s-au testat cu privire la legare în FACS de un amestec de linii celulare antigen-pozitive (marcate cu DiD) și negative (nemarcate) prin incubare cu fagi (30μl) într-un total de 100μl tampon FACS (PBS, conținând 0.5% BSA și 0.5mM EDTA) conținând 4% lapte. După trei spălări, fagii legați s-au detectat prin colorare cu un anticorp anti-M13 biotinitat (Fitzgerald, nr. cat. 61R-M101ABTB62-FEZ, 1:125 în tampon FACS, 30 minute pe gheață) și streptavidină marcată cu PE (Invitrogen, nr. cat. SA1004-4; 1:400 în tampon FACS 15 minute pe gheață). Celulele colorate au fost analizate folosind FACS Canto (Becton & Dickinson).

Anticorpi care ținesc RTK

Anticorpii cLC care ținesc EGFR și HER3 s-au obținut folosind metodele descrise anterior (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30) din repertorii mari de anticorpi fagici sintetici generați intern (HER3) sau din repertorii de anticorpi fagici generați de la șoareci MeMo imunizați cu succes (EGFR). Metodele de generare a anticorpilor la EGFR și HER3 și șanțurile VH ale domeniului variabil pentru anticorpii EGFR și HER3 au fost descrise în cererile WO 2015/130173 A1 și WO 2015/130172 A1.

Re-clonarea cADN care codifică VH din vector fagemid în vectori de expresie IgG

S-au secvențiat cADN-urile care codifică VH ale tuturor clonelor specifice pentru țintă. O selecție de clone unice pe baza identității secvențiale și analizei cluster-ului (Figura 25) s-a re-clonat în vectori de expresie IgG diferiți folosind *Sfi1-BstEII* sau o digestie *Sfi1/XhoI* și ligarea grupului de cADN-uri digerate în plasmida de expresie IgG conform tehnicilor biologice moleculare standardizate.

Generarea anticorpilor bispecifici

Anticorpii bispecifici s-au generat prin co-transfecția temporară a două plasmide care codifică IgG cu domenii VH diferite, folosind o tehnologie de inginerie CH3 brevetată pentru a asigura hetero-dimerizarea eficientă și formarea anticorpilor bispecifici. Lanțul ușor comun este de asemenea co-transfectat în aceeași celulă, pe aceeași plasmidă sau pe o altă plasmidă.

În cererile noastre (de ex. WO2013/157954 și WO2013/157953;) am divulgat metode și mijloace de producere a anticorpilor bispecfici dintr-o singură celulă, fiind prevăzute mijloace care favorizează formarea anticorpilor bispecfici față de formarea anticorpilor monospecific. Aceste metode pot fi folosite de asemenea în mod favorabil în prezenta invenție. În mod specific, mutațiile preferate pentru producerea în esență numai a moleculelor IgG bispecifice în lungime completă sunt substituțiile aminoacidice la pozițiile 351 și 366, de ex. L351K și T366K (numerotare conform EU) în primul domeniu CH3 (lanțul greu 'variantea KK') și substituțiile aminoacidice la pozițiile 351 și 368, de ex. L351D și L368E în al doilea domeniu CH3 (lanțul greu 'variantea DE') sau vice versa. S-a demonstrat anterior în cererile noastre că lanțul greu varianta DE încărcat negativ și lanțul greu varianta KK încărcat pozitiv se împerechează preferențial pentru a forma heterodimeri (numite molecule bispecifice 'DEKK'). Homodimerizarea lanțurilor grele varianta DE (homodimeri DE-DE) sau lanțurilor grele varianta KK (homodimeri KK-KK) are loc rareori din cauza respingerii puternice între reziduurile încărcate în interfața CH3-CH3 dintre lanțuri grele identice.

Genele VH care codifică anticorpii care leagă LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43 descriși mai sus au fost clonate în vectorul care codifică domeniul CH3 încărcat pozitiv și anticorpii care țintesc RTK (EGFR sau HER3) obținuți anterior și divulgați în WO 2015/130172 s-au clonat în vector care codifică domeniul CH3 încărcat negativ. Celulele 293F Freestyle adaptate creșterii în suspensie au fost cultivate în baloane T125 cu agitare până la o densitate de 3.0×10^6 celule/ml. Celulele au fost însămânțate la o densitate de $0.3-0.5 \times 10^6$ celule viabile/ml în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri adânci. Celulele au fost transfectate temporar cu un amestec de două plasmide care codifică anticorpi diferiți, clonate în sistem de vectori brevetat. La șapte zile după transfecție, supernatantul celular a fost recoltat și filtrat printr-un filtru de $0.22 \mu\text{M}$ (Sartorius). Supernatantul steril a fost depozitat la 4°C până la purificarea anticorpilor.

Generarea anticorpilor monoclonali

S-a reclonat de asemenea o selecție de secvențe VH într-un vector de expresie IgG1 care codifică IgG monospecific, bivalent. Celulele 293F Freestyle adaptate creșterii în suspensie au fost cultivate în baloane T125 cu agitare până la o densitate de 3.0×10^6 celule/ml. Celulele au fost însămânțate la o densitate de $0.3-0.5 \times 10^6$ celule viabile/ml în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri adânci. Celulele au fost transfectate temporar cu amestecuri ADN: PE1 sterile individual conform procedurilor standardizate și cultivate. La șapte zile după

transfecție, supernatantul a fost recoltat și filtrat printr-un filtru de 0.22 μ M (Sartorius). Supernatantul steril a fost depozitat la 4°C până la purificarea anticorpului prin cromatografie de afinitate cu proteina A.

Clonarea și expresia anticorpilor comparativi care țintesc LGR5, FZD7 și R-spondin3.

Anticorpii care recunosc în mod specific EGFR, FZD, RSPO3 sau LGR5 sunt cunoscuți în domeniu. Anticorpii comparativi s-au realizat conform informațiilor publicate: secvențele cADN care codifică VH și VL au provenit din brevete publicate și s-au clonat într-un vector de expresie care codifică o moleculă IgG1 umană în lungime completă. Anticorpii au fost exprimați apoi în celule 293F Freestyle prin transfecție temporară și purificați din supernatant de cultură folosind cromatografie de afinitate cu proteina A conform procedurilor standard. Anticorpul hu8E11v2 (anti-LGR5) s-a copiat din brevetul US 2013/0336885 A1 (Genentech). Informațiile secvențiale pentru anticorpul BNC101 (anti-LGR5) s-au obținut din brevetul US2016/0031984 A1 (Bionomics Inc.). Secvența care codifică anticorpul OMP18R5 (anti-FZD) a fost copiată din brevetul AU2014/212081 A1 (Oncomed Pharmaceuticals Inc.). Secvențele de anticorp OMP18R20 și OMP18R21 (anti-LGR5) s-au copiat din brevetul US 8,628,774 B2 (Oncomed Pharmaceuticals Inc.). Secvența care codifică OMP131R10 (anti-RSPO3) a fost copiată din brevetul WO 2016/090024 A2 (Oncomed Pharmaceuticals Inc.). S-a folosit un lot clinic de cetuximab (Erbix®). O listă a anticorpilor copiați și numărul intern acordat acestor versiuni se indică în Tabelul 7.

Purificarea IgG pentru selecție funcțională

Purificarea IgG s-a efectuat pe o scară mică (< 500 μ g), scară medie (<10 mg) și scară mare (>10 mg) folosind cromatografie de afinitate cu proteina A. Purificările la scară mică s-au efectuat în condiții sterile în plăci de filtrare cu 24 de godeuri folosind filtrare. Mai întâi, pH-ul mediului a fost ajustat la pH 8.0, după care supernatanții conținând IgG s-au incubat cu sfere de proteină A Sepharose CL-4B (50% v/v) (Pierce) 2 h la 25°C pe o platformă de agitare la 600 rpm. Sferele au fost recoltate apoi prin filtrare. Sferele s-au spălat de două ori cu PBS pH 7.4. IgG legat a fost eluat la pH 3.0 cu 0.1 M tampon citrat și eluatul a fost neutralizat imediat folosind Tris pH 8.0. Schimbul de tampon s-a efectuat prin centrifugare folosind plăci multiple Ultracel 10 cu filtre multiple (Millipore). Probele au fost recoltate în PBS pH7.4. Concentrația IgG s-a măsurat folosind Octet. Probele de proteină s-au depozitat la 4°C.

Cuantificarea IgG folosind Octet

Pentru a determina cantitatea de IgG purificat, concentrația anticorpului s-a determinat prin analiza Octet folosind biosenzori de proteina A (Forte-Bio, conform recomandărilor furnizorului) folosind IgG uman total (Sigma Aldrich, nr. cat. 14506) ca standard.

Caracterizarea legării IgG specific LGR4/LGR5/ZNRF3/RNF43

Anticorpilor care țintesc LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43 au fost exprimați mai întâi ca anticorpi bispecifici cu lanț ușor comun cu un al doilea braț Fab care recunoaște un antigen non-relevant (control): toxoidul tetanic. Anticorpilor au fost testați cu privire la legare în FACS de celule Freestyle 293F care supraexprimă hLGR4, hLGR5, hZNR3 sau hRNF43. Celulele au fost recoltate și diluate la 10^6 celule/ml în tampon FACS (PBS/0.5%BSA/0.5mM EDTA). S-au adăugat $1-2 \times 10^5$ celule în fiecare godeu într-o placă cu 96 de godeuri cu fund U. Celulele au fost centrifugate 2 minute la 300 g la 4°C. Supernatantul a fost îndepărtat prin răsturnarea plăcii(ilor). S-au adăugat 50μl din fiecare probă de IgG (pentru selecție, diluat la o concentrație de 5μg/ml în tampon FACS) și s-au incubat 1H pe gheață. Celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu 150μl de tampon FACS. S-au adăugat 50μl IgG PE de capră anti uman diluat 1:400 (Invitrogen) și s-au incubat 30 de minute pe gheață în întuneric. După adăugarea tamponului FACS, celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu tampon FACS. Celulele au fost analizate pe un citometru în flux FACSCanto (Becton & Dickinson) într-un mediu HTS. Legarea anticorpilor de celule s-a evaluat măsurând intensitatea medie a fluorescenței (MFI) populației celulare colorate. S-a considerat că anticorpilor își leagă ținta când MFI a fost cel puțin de cinci ori mai mare decât cea a aceleași populații celulare colorate cu un anticorp fără legare (control negativ) (direcționat către toxoidul tetanic).

Pentru testarea reactivității de legare, s-au folosit și teste ELISA. IgG bispecifici care țintesc LGR4 și LGR5 s-au testat cu privire la reactivitate față de antigenele rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc și toxoid tetanic. Anticorpilor ZNRF3 și RNF43 au testat cu privire la reactivitate față de antigenele rhZNRF3-Fc, rhRNF43-Fc și toxoid tetanic. Antigenele au fost aplicate peste noapte pe plăci ELISA MAXISORP™. Godeurile plăcilor ELISA s-au blocat cu PBS (pH 7.2) conținând 5% BSA 1 oră. Anticorpilor selectați au fost testați la o concentrație de 5μg/ml diluați în PBS-5% BSA și au fost lăsați să se lege 1 oră la 25°C. Alternativ, la titrarea IgG bispecific, s-a preparat o serie de diluții de două ori în șapte etape începând de la 5μg/ml sau 8μg/ml. Ca un control, procedura s-a efectuat simultan cu un anticorp din comerț specific pentru antigenele

aplicate și un anticorp de control anti-toxoid tetanic. Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% v/v Tween 20). IgG legat a fost detectat cu HRP-conjugat diluat 1:2000 (IgG de capră anti-uman Becton Dickinson) și a fost lăsat să se lege 1 oră la 25°C. Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% Tween 20) și IgG legat a fost vizualizat prin colorare TMB/H₂O₂ și colorarea a fost cuantificată prin măsurare OD_{450nm}.

Clasificarea de afinitate a IgG specific LGR4/LGR5/ZNRF3/RNF43 IgG în FACS

Celulele au fost recoltate și diluate la 10⁶ celule/ml în tampon FACS (PBS/ 0.5%BSA/ 0.5mM EDTA). S-au adăugat 1-2 x10⁵ celule în fiecare godeu al unei plăcu FACS cu 96 de godeuri cu fund U. Celulele au fost centrifugate 2 minute la 300g at 4°C. Supernatantul a fost îndepărtat prin răsturnarea plăcii(lor). S-au adăugat 50μl din fiecare probă de IgG într-o diluție în serie de două ori în șapte etape începând de la 5μg/ml și s-au incubat 1h pe gheață. Celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu 150μl de tampon FACS. S-au adăugat 50μl de IgG PE de șoarece anti uman diluat 1:400 (Invitrogen) și s-au incubat 30 de minute pe gheață în întuneric. După adăugarea tamponului FACS, celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu tampon FACS. Celulele au fost analizate pe un citometru în flux FACSCanto într-un mediu HTS. Legarea anticorpilor de celule a fost cuantificată măsurând intensitatea medie a fluorescenței (MFI) și calculând zona de sub curbă (AUC) rezultată din graficele MFI în funcție de concentrația anticorpului folosită pentru colorare.

Purificarea IgG pentru studii funcționale

Purificările la scară medie s-au efectiat pe un sistem ÄKTAexplorer 100 folosind coloane HiTrap MabSelect Sure și coloane de desalinare HiTrap. Probele s-au încărcat la 5 ml/min. Coloana a fost spălată cu 2 volume de coloană de PBS. IgG a fost eluat la pH 3.0 cu 0.1 M tampon citrat. Apoi proba a fost desărată și introdusă într-un tampon final de PBS pH 7.4. IgG s-au filtrat printr-un filtru de 0.45 μM (Sartorius). Concentrația IgG s-a măsurat folosind OD₂₈₀. Probele de proteină s-au depozitat la -80°C.

Testarea anticorpilor cu privire la reactivitate cu ortologul murin al țintei

Pentru testarea reactivității de legare mLgr4, s-a folosit un test ELISA. Ambii anticorpi care ținesc LGR4 și LGR5 au fost testați cu privire la reactivitate față de proteina mLgr4-Fc

recombinantă (RND systems, nr. cat. 8077-GP). mLgr4-Fc s-a aplicat peste noapte pe plăci ELISA MAXISORP™. Godeurile plăcilor ELISA au fost blocate cu PBS (pH 7.2) conținând 5% BSA 1 oră. Anticorpul selectat a fost testat la o singură concentrație de 5 μg/ml diluată în PBS-5% BSA și au fost lăsați să se lege 1 oră la 25°C. Ca un control, procedura s-a efectuat simultan cu un anticorp din comerț specific pentru antigenul aplicat și un anticorp de control (anti-TT cLC). Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% v/v Tween 20). IgG legat a fost detectat cu HRP-conjugat diluat la 1:2000 (IgG de capră anti-uman; Becton Dickinson) și a fost lăsat să se lege 1 oră la 25°C. Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% Tween 20) și IgG legat a fost vizualizat prin colorare TMB/H₂O₂; colorarea s-a cuantificat prin măsurarea OD_{450nm}.

IgG bispecifici au fost de asemenea testați cu privire la legare în FACS de celule Freestyle 293F care exprimă temporar mLgr5, mZnr3 sau mRnf43. Celulele au fost transfectate așadar temporar cu constructe care codifică mLgr5, mZnr3 sau mRnf43 (pEF1_mLgr5-Myc-HIS, pDisplay_mZnr3-Myc-PDGFR(TM), pDisplay_mRnf43-Myc-PDGFR(TM)) folosind lipofectamina și au fost recoltate și diluate la 10⁶ celule/ml în tampon FACS (PBS/0.5%BSA/0.5mM EDTA). S-au adăugat 1-2 x10⁵ celule în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri cu fund U. Celulele au fost centrifugate 2 minute la 300 g la 4°C. Supernatantul a fost îndepărtat prin răsturnarea plăcii(ilor). S-au adăugat 50 μl din fiecare probă de IgG la o concentrație de 5 μg/ml și s-au incubat 1 oră pe gheață. Celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu tampon FACS. S-au adăugat 50 μl de IgG PE de șoarece anti uman diluat la 1:400 (Invitrogen) și s-au incubat 30-60 minute pe gheață în întuneric. După adăugarea tamponului FACS, celulele au fost centrifugate o dată, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de două ori cu tampon FACS. Celulele au fost analizate pe un citometru în flux FACSCanto într-un mediu HTS. Legarea anticorpilor de celule s-a cuantificat măsurând intensitatea medie a fluorescenței (MFI) populației celulare transfectate.

Testul ELISA de blocare R-Spondin3

Toate cele patru ținte WNT au R-Spondin ca ligand (Prog Biophys Mol Biol. 2015 Sep;118(3):112-8; J Struct Biol. 2015 Aug; 191(2): 149-55). Pentru fiecare țintă, s-a dezvoltat un test de blocare a ligandului pentru a testa capacitatea anticorpilor specifici țintei (LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43) pentru a perturba legarea R-Spondin3 de țintă. Legarea proteinelor de fuziune Fc ale ECD al țintei de R-Spondin3 acoperit s-a testat în prezența unui surplus de

cLC IgG direcționat către LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43. În cazul în care cLC IgG se leagă de situsul de legare R-Spondin3, proteina de fuziune Fc nu s-ar mai putea lega de stratul de acoperire și semnalul ELISA s-ar pierde. R-Spondin3 recombinant (RND systems) s-a aplicat pe godeurile unei plăci ELISA MAXISORP™. Godeurile plăcilor ELISA au fost blocate cu PBS (pH 7.2) conținând 5% BSA 1 oră. Anticorpul selectat a fost testat cu privire la blocare la o concentrație de 15 μg/ml diluată în PBS-5% BSA în prezența proteinei țintă recombinante umane (rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc). Complexul IgG/proteină țintă umană recombinantă a fost preincubat 10 minute înainte de adăugarea în placa acoperită cu R-Spondin3 10 minute - 2 ore. Ca un control pentru blocare, procedura s-a efectuat simultan adăugând un surplus (15 μg/ml) de rhR-Spondin3 în loc de IgG. Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% v/v Tween 20). Proteina Fc legată a fost detectată cu conjugat HRP IgG anti-uman diluat la 1:2000 (IgG de capră anti-uman Bethyl labs) și a fost lăsată să se lege 1 oră la 25°C. Plăcile ELISA au fost spălate de 3 ori cu PBS-T (PBS-0.05% Tween 20) și complexul legat a fost detectat prin colorare cu TMB/H₂O₂; colorarea s-a cuantificat prin măsurarea OD450nm.

Măsurarea afinității de legare a anticorpului bispecific de antigen exprimat pe suprafața celulară.

PB10651 afucozilat a fost radio-marcant cu ¹²⁵I folosind IODO-GEN conform protocolului descris de van Uhm *et al.* Imuno-reactivitatea anticorpului după radiomarcare s-a investigat cu metoda descrisă de Lindmo *et al.* Măsurătorile de afinitate celulară în stare constantă ale ¹²⁵I-PB10651 s-au efectuat cu celule CHO care exprimă EGFR sau LRG5 pentru a investiga afinitatea față de EGFR și LGR5. În plus, s-a determinat afinitatea față de linia celulară DLD-1 care exprimă endogen EGFR, dar fără LGR5 detectabil. Testul a folosit o concentrație constantă de (celule) țintă și cantitatea de radio ligand a fost titrată fără a încălca ipotezele care stau la baza măsurătorilor de afinitate în condiții în stare constantă. Legarea nespecifică (NSB) a fost evaluată prin prezența unui excident molar 100x de PB10651 nemarcat într-o serie paralelă. Testul a fost repetat de două ori și valoarea K_D estimată este raportată ca media a trei experimente independente. Estimarea valorilor K_D s-a efectuat folosind regresie neliniară GraphPad Prism v. 6.0h, One-Site -- legarea totală și nespecifică cu constrângerea că valorile K_D trebuie să fie mai mare decât 0.

Referințe:

Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PA. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods*. 1984; 72: 77-89.

van Uhm JI, Visser GW, van der Schans MJ, Geldof AA, Meuleman EJ, Nieuwenhuijzen JA. The ultimate radiochemical nightmare: upon radio-iodination of Botulinum neurotoxin A, the introduced iodine atom itself seems to be fatal for the bioactivity of this macromolecule. *EJNMMI Res*. 2015; 5: 5.

Reprezentarea epitopilor prin analiză de mutageneză shotgun

Epitopii de pe EGFR și LGR5 recunoscuți de PB10651 s-au determinat prin analiză de mutageneză shotgun conform metodei descrise de Davidson *et al.*, (2014). S-au realizat două biblioteci de mutații din cele două antigene: o bibliotecă a cuprins a.a. 300-520 (domeniul de legare a ligandului L2 sau domeniul III) al EGFR uman (secvența de referință GenBank NP_005219.2), iar cealaltă a.a. 22-560 (domeniul N-terminal până la primul helix transmembranal) al LGR5 uman (secvența de referință GenBank AAH96324.1). Constructul de expresie LGR5 a fost trunchiat la a.a. 834 pentru a crește expresia de pe suprafața celulară a receptorului. Anticorpii dezvoltati intern care țintesc un epitop diferit s-au folosit ca anticorpi de control pentru expresia mutanților.

Referință

Davidson, E. & Doranz, B.J. (2014) A high-throughput shotgun mutagenesis approach to mapping B-cell antibody epitope. *Immunology* 143, 13-20.

Competiție pentru legarea LGR5 între brațul Fab LGR5 în PB10651 și ligandul R-spondin1 folosind un test pe bază de celule.

Versiunea copiată din literatură a anticorpului OMP88R20 (denumit PG7711) descris în brevetul US 8,628,774B2) s-a folosit ca un control de blocare a ligandului pentru realizarea unui test de demonstrare a capacității de blocare a ligandului a brațelor Fab anti-LGR5. S-a generat o clonă celulară derivată din CHO-K1 care a supraexprimat LGR5 uman prin transfecția temporară a celulelor CHO-K1 cu constructul de expresie care codifică LGR5, după care s-au selectat clone rezistente la antibiotic (G418) prin limitarea diluției. Legarea versiunii copiate a OMP88R20 de această linie celulară a fost testată într-o serie de diluții ale

anticorpului și s-a determinat EC50 pentru legare. S-a măsurat apoi legarea anticorpului de clona celulară CHO care exprimă LGR5 la concentrația EC50 în FACS în prezența unor cantități în creștere ale ligandului R-spondin1 (R&D Systems, nr. cat. 4645-RF/CF). Pentru a testa dacă legarea anti-LGR5 Fab (MF5816) a PB10651 de LGR5 poate fi inhibată de legarea ligandului, anticorpul a fost testat cu privire la legarea LGR5 la 100ng/ml în prezența unor cantități în creștere ale ligandului R-spondin1. S-a efectuat un test similar folosind anticorpul anti-LGR5 de șobolan 1D9 raportat că se leagă de regiunea juxta-membranară a LGR5 (de Lau et al., 2011) pentru a indica specificitatea interacțiunii.

Capacitatea de blocare a ligandului a brațului Fab anti-EGFR în PB10651.

Pentru testarea anti-EGFR IgG cu privire la efectele asupra semnalizării induse de EGF, s-au testat cu privire la capacitatea de a preveni moartea celulară apoptotică indusă de EGF a celulelor A431. Pe scurt, concentrațiile mari (10nM) de EGF induc moartea (apoptotică) a celulelor A431 (Gulli *et al.*, 1996). Acest efect poate fi inversat dependent de doză adăugând anticorpi anti-EGFR de blocare a ligandului, cum ar fi cetuximab (anticorpul 225 murin este echivalentul de șoarece al cetuximab). Celulele A431 au fost așezate la 1500 celule/godeu în plăci de cultură tisulară cu 96 de godeuri și crescute peste noapte. Ziua următoare, anticorpul s-a adăugat la concentrațiile indicate împreună cu 62.5ng/ml (10nM) de EGF uman, recombinant (R&D Systems, nr. cat. 236-EG) și celulele au fost crescute trei zile. După trei zile, s-a determinat numărul de celule metabolice active adăugând alamar blue (Invitrogen, nr. cat. DAL1100) și măsurând fluorescența și emisie 590nm cu excitație 560nm. Toți IgG anti-EGFR au fost testați cu privire la efectele de blocare EGF în acest test comparativ cu cetuximab.

Referință:

Gulli, L.F., et al., Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ*, 1996. 7(2): p. 173-178.

Testul de stabilitate termică

Pentru a obține o indicație cu privire la stabilitatea IgG bispecific, toți IgG s-au incubat la 40°C timp de o săptămână în mediu conținând ser (DMEM, conținut mare de glucoză (Gibco, nr. cat. 41966-029), suplimentat cu 9% ser bovin fetal (Thermo Scientific nr. cat. SV30180))

și s-au testat pentru legare în ELISA (în esență așa cum s-a descris mai sus). ELISA a constatat din aplicarea a 2μg/ml de antigen (rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc), folosind 100μl la 5μg/ml IgG și blocare în 5% BSA în PBS. În acest test, s-a comparat legarea aceluiași IgG (în mediu conținând ser) menținut la 2-8°C (frigider) de antigen cu cea a IgG menținut la 40°C. S-a calculat pierderea procentuală a legării după 1 săptămână de incubare la 40°C.

Culturi de organoide de cancer colorectal (CRC)

Organoidele CRC s-au produs conform descrierii (Van de Wetering et al. 2015 Cell 161:933-45) sub formă de bănci celulare și s-au expediat pentru teste de screening pe gheață uscată în fiole congelate la o densitate de 1.500.000 celule per 1ml de mediu de îngheț (ser bovin fetal conținând 10% DMSO ca un agent de crioprotecție). Criotuburile se depozitează la -80°C pentru utilizare în termen de 3 luni sau la -150°C pentru depozitare pe termen lung.

Medii de cultură

Mediul de amplificare tumoroidă a fost produsă prin îmbogățirea a 500ml Advanced DMEM (Thermo Fisher 12491-023) cu 5ml 100x penicilină-streptomicină (Thermo Fisher 15140-122), 5ml 100x Glutamax (Thermo Fisher 35050-038) și 5ml 1M Hepes (Thermo Fisher 15630-056). În 70ml de Advanced DMEM îmbogățit, s-au adăugat 20ml mediu condiționat R-spondin 1 și 10ml de mediu condiționat Noggin (Van de Wetering et al. 2015 Cell 161:933-45) pentru a prepara 100ml de mediu de amplificare tumoroidă care s-a suplimentat apoi cu 2ml supliment 50x B27 (Thermo Fisher 17504-044), 1ml 1M Nicotinamidă (Sigma-Aldrich N0636), 250μl 500mM N-Acetil Cisteină (Sigma-Aldrich A9165), 10μl 5mM A83-01 (inhibitor TGFβ, Tocris 2939) și 33μl 30mM SB202190 (inhibitor p38, Sigma Aldrich S7067). Mediul de amplificare tumoroidă a fost suplimentat de asemenea cu 100μl 10mM Y27632 (inhibitor de kinază Rho, Abmole Y-27632 diclorhidrat) la însămânțarea proaspătă a tumoroidelor de colon în prezența EGF uman (Peprotech AF-100-15) sau NRG-1/HRG uman (ImmunoTools 11343047). EGF și HRG sunt factorii de creștere care stimulează amplificarea organoidelor și doza acestora determină sensibilitatea testului de screening. EGF s-a adăugat la doze de 2.5ng/ml, 5ng/ml sau 10ng/ml în timpul selecției sau 10ng/ml sau 50ng/ml în timpul amplificării. HRG s-a folosit individual la 5ng/ml.

Mediul de aplicare a organoidelor de tip sălbatic este egal cu mediul de amplificare tumoroidă, cu o înlocuire: 70ml de Advanced DMEM îmbogățit a fost înlocuit de o combinație de 20ml de Advanced DMEM îmbogățit și 50ml de mediu condiționat WNT3A (Van de Wetering et al. 2015 Cell 161:933-45). Organoidele de colon provenite din țesut normal și tumoroidale de colon cu APC de tip sălbatic sunt dependente de WNT și necesită așadar prezența WNT pentru amplificare.

Compoziția gelului

Tumoroidele de colon congelate s-au dezghețat rapid într-o baie de apă la 37°C și s-au colectat în 5ml de Advanced DMEM îmbogățit. Organoidele au fost peletizate prin centrifugare 5 minute la 1000rpm la 4°C. Supernatantul a fost îndepărtat și organoidele s-au colectat în mediu de amplificare tumoroidă fără factori de creștere. Această suspensie de organoide s-a amestecat cu extract membranar bazal de factor de creștere redus Cultrex, tip 2, PathClear (Amsbio 3533-010-02). Procentajul final al gelului Cultrex a fost 60% și numărul de celule per ml a fost 100.000.

Determinarea răspunsului la factor de creștere al organoidelor provenite de la pacienți

Pentru a determina dacă organoidele provenite de la pacienți răspund la tratament cu factor de creștere, au fost însămânțate așa cum s-a descris mai sus în prezența sau absența factorilor de creștere (EGF (5ng/ml) sau NRG (5ng/ml)) și apoi cultivate 5 zile. Numărul celulelor viabile s-a determinat folosind testul de viabilitate celulară Cell Titer Glo (Promega, nr. cat. G7571). Citirea luminescenței folosind celule stimulate cu factor de creștere s-a comparat cu cea obținută folosind celule nestimulate.

Prepararea plăcilor de cultură

Gelifierea a fost mai rapidă în plăci de cultură preîncălzițe. Prin urmare, toate plăcile de cultură au fost așezate la 37°C într-un incubator umidificat CO₂ (Eppendorf) cu o zi înainte de însămânțarea celulelor.

Pentru amplificarea tumoroidelor de colon, s-au folosit plăci cu 24 de godeuri sau 6 godeuri (Greiner Bio-One) și s-au aplicat per godeu 3 sau 10 picături de 15μl gel/suspensie de organoid la distanțe regulate. Mediul de amplificare tumoroidă (0.5ml sau 2ml) conținând între 10ng/ml și 50ng/ml EGF s-a adăugat după o perioadă de gelifiere de 30 de minute la 37°C. În

ziua 1 a însămânțării, mediul de amplificare tumoroidă a conținut 10 μ M Y27632. S-au realizat înlocuiri ale mediului în timpul amplificării cu mediu de amplificare tumoroidă conținând EGF, lipsit de Y27632.

Pentru efectuarea unei selecții, s-au folosit plăci transparente cu 384 de godeuri (Greiner Bio-One 781091). S-au distribuit per godeu 15 μ l din amestecul de gel/organoid prin manipulare automată a lichidului. La 30 de minute de gelifiere la 37°C, s-au adăugat 45 μ l de mediu de amplificare tumoroidă (sau mediu de amplificare a organoidelor, după caz) deasupra gelului din fiecare godeu. Mediile au fost suplimentate cu sau fără factori de creștere și anticorpii (de referință) și compușii s-au amestecat cu mediul în plăci cu 96 de godeuri cu fund v înainte de aplicării în plăcile cu 384 de godeuri cu gelul solidificat.

Prepararea plăcilor principale de anticorp

Anticorpii de referință (Cetuximab (4°C), anticorpii de control negativ, anticorpii care ținesc HER3 sau EGFR cu un singur braț și anticorpii HER3/EGFR (pe gheață uscată)) au fost transportați și depozitați la 4°C pentru screening. Anticorpii bispecifici și monospecifici s-au furnizat în plăci cu 96 de godeuri adânci sigilate și transportate la 4°C. În general, denumirea anticorpilor cLC monospecifici în exemple este indicată de prefixul 'PG', în timp ce denumirea anticorpilor cLC bispecifici este indicată de prefixul 'PB'. Pentru claritate, fragmentele Fab ale anticorpilor cLC sunt recunoscute de prefixul 'MF'. Anticorpii s-au transferat manual în patru plăci cu 96 de godeuri cu fund v (Greiner Bio-One 736-0118) în poziții randomizate de la godeul B02 la godeul G11 (60 de godeuri interioare). Anticorpii de referință s-au adăugat în plăci de asemenea în poziții aleatorii, la concentrație egală. Aceste plăci principale de anticorp s-au folosit pentru prepararea plăcilor cu diluare 1:10 în PBS. Plăcile principale și plăcile de diluare s-au depozitat sigilate la 4°C. Pentru validarea rezultatelor selecției, s-a expediat un grup principal de IgG bispecifici (46 anticorpi la o concentrație de 0.5mg/ml) în microfiole cu capac, pentru a permite randomizarea ușoară a anticorpilor în plăci de screening și pentru a preveni contaminarea încrucișată și evaporarea. Înaintea fiecărui experiment, IgG bispecifici s-au așezat într-o placă cu 96 de godeuri cu fund v (60 de godeuri interioare) împreună cu anticorpi de referință la 0.1mg/ml prin diluare în PBS. Această placă s-a diluat încă o dată la 1:5 în PBS pentru a obține o a doua placă ce conține anticorpi la 20 μ g/ml. Diluările și explunerile plăcilor s-au efectuat folosind manipulatorul de lichid Felix.

Regimuri de expunere

Plăcile principale de anticorp cu 96 de godeuri cu fund v, cu doză mare și doză mică, s-au diluat la 1:10 în mediu de cultură înaintea expunerii. Concentrațiile de anticorp aplicate în selecția primară au fost 10μg/ml și 1μg/ml sau 40μg/ml și 4μg/ml; iar în testul de validare, dozele de anticorp au fost 10μg/ml și 2μg/ml. Anticorpul s-a adăugat în organoide la 30 de minute după însămânțare. Expunerea anticorpilor înaintea fixării plăcilor a fost minim 7 zile și maxim 9 zile.

Fixare și imagistică

Pentru prepararea plăcilor de tumoroid expuse pentru imagistică, organoidele au fost fixate și colorate pentru vizualizarea nucleilor și citoscheletului actinei așa cum s-a descris anterior (Di et al PlosOne 2014, PMID 25289886). Imagistica plăcilor s-a efectuat folosind un Molecular Devices ImageXpress Micro XLS conectat la un braț robot Twister II descris anterior (Sandercock et al, Molecular Cancer 2015, PMID 26227951). Pe scurt, s-au captat imagini z-stack din fiecare godeu al unei plăci cu 384 de godeuri folosind o lentilă 4x, cu o treaptă z de 50μm. Numărul secțiunilor per godeu a variat de la 20 de secțiuni la 24 de secțiuni, pentru a acoperi întregul interval al adâncimii gelului în fiecare godeu.

Analiza imaginilor

Imaginile captate au fost stocate într-un server de date central, accesibil în platforma de analiză a imaginilor 3D Ocello Ominer™ care permite analiza paralelă directă a imaginilor 3D prin modelul său de calcul distribuit. Softul analizează structura obiectelor (nuclei și citoschelet) detectate în fiecare godeu și pozițiile lor relative. La analiză, rezultatul a fost verificat pentru a detecta calitatea imaginilor brute și metoda de analiză. Măsurătorile per obiect produse de software (pentru nucleii, organoide, nucleii din organoide, lumene, poziționarea relativă a lumenelor în organoide și întreaga structură (organoide, nuclei și lumene)) au fost centralizate per godeu și datele s-au cuplat cu informațiile de configurație a plăcii (linie celulară, condiția factorilor de creștere, tratament etc.). La centralizare, datele au fost verificate cu privire la consecvență în tratamentele de control, absența efectelor marginale, consecvență între reproduceri și factorul z' între controlul pozitiv și negativ. Apoi, datele au fost normalizate la punctaj z și inspectate prin încărcare în TIBCO Spotfire® pentru eliminarea deviațiilor extreme. S-au colectat 500 de caracteristici morfologice diferite; datele au fost trecute printr-o serie de statistici care au realizat o subselecție de 3 până la 20 din ~500 caracteristici colectate din imaginile z-stack, pe baza capacității acestui set de caracteristici de

a distinge efectul tratamentului de referință de morfologia controlului negativ. Distanța dintre referință și controlul negativ s-a calculat ca o măsurare a distanței euclidiene (Figura 5) și s-a punctat între zero și unu. Acest punctaj unificat al modificării morfologice s-a folosit pentru deosebirea rezultatelor din teste compuse. Măsurătorile caracteristicilor selectate individuale, împreună cu coroborarea cu imaginile se folosesc pentru a confirma efectele tratamentelor asupra organoidelor.

Factor Z': factorul Z' este o măsură statistică a calității unui test de screening de mare capacitate și indică fereastra de separare între controlul pozitiv și negativ. Factorul Z' este definit ca 1 minus 3 ori suma abaterilor standard ale controlului pozitiv și negativ împărțit la diferența absolută între mediile controlului pozitiv și negativ. Valorile Z' mai mici decât 0 indică faptul că există o suprapunere prea mare între controlul pozitiv și negativ, valorile între 0 și 0.5 indică o fereastră utilă, dar marginală, și valorile între 0.5 și 1.0 indică un test excelent cu o separare puternică între controlul pozitiv și negativ.

Colorarea FACS a celulelor obținute din organoid P18T folosind anticorpi cLC anti-LGR5 selectați

Organoidale provenite dintr-o probă de cancer colorectal au fost cultivate în 100% extracte membranare bazale (BME, Amsbio), la 37°C și 5% CO₂, cu mediu alcătuit din Advanced DMEM/F12 (Invitrogen) suplimentat cu: 2mM GlutaMax (Invitrogen), 10mM HEPES (Invitrogen), 1x B27 fără acid retinoic (Invitrogen), 50ng/mL EGF (PeproTech), 0.1μg/mL Noggin (PeproTech), Rock-inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich), 10nM PGE₂ (Sigma-Aldrich), 3μM SB202190 (Sigma-Aldrich), 10nM Gastrin (Tocris), 1μg/ml R-SPO1 (preparat intern), 10mM Nicotinomidă (Sigma-Aldrich), 1.25mM N-Acetil-cisteină (Sigma-Aldrich), 0.5μM A83-01 (Tocris). În ziua de dinaintea analizei, organoidale au fost descompuse în celule individuale. În acest scop, organoidale au fost eliberate mai întâi din BME prin îndepărtarea mediului de cultură și re-suspensia BME în soluție de recuperare celulară (BD Biosciences) și incubare 1 oră pe gheață. Apoi, organoidale au fost centrifugate (toate treptele centrifugei au fost de 5 minute, 200g la 4°C). Peletul a fost re-suspendat în 1mL de 50% soluție de tripsină/EDTA (TE); 50% PBS, s-a introdus și s-a extras cu pipeta și s-a evaluat vizual în mod regulat până când s-a obținut o singură suspensie celulară. TE s-a diluat în 10mL de PBS și s-a centrifugat. Celulele au fost spălate de două ori în 10mL de PBS înaintea re-suspensiei în BME și împărțirii în picături de 50μL pe plăci preîncălzite (37°C). Picăturile BME au fost lăsate să se fixeze 15 minute înainte să se adauge 500μL de mediu per picătură.

După 12 re, celulele au fost izolate din BME folosind soluție de recuperare celulară. După 1 oră pe gheață, celulele au fost centrifugate și spălate o dată în 10mL de PBS conținând 0.5% BSA și 0.5mM EDTA (tampon de colorare). Peletul a fost re-suspendat în tampon de colorare și numărat. S-au folosit maxim 100.000 celule/100pL de anticorp. După determinarea numărului adecvat de celule, au fost centrifugate și re-suspendate în 100μL de tampon de colorare conținând anticorpul primar (IgG monoclonal și bispecific) diluat la 10μg/mL. Celulele au fost incubate pe gheață 45 de minute, cu inversare regulată a tuburilor pentru a asigura colorare omogenă. După incubare, celulele au fost spălate în 1mL de tampon de colorare și centrifugate. Celulele au fost spălate din nou în 1mL de tampon de colorare înaintea incubării cu 100μL tampon de colorare conținând un anticorp IgG anti-uman conjugat cu R-PE (Invitrogen, H10104) diluat la 1:400. Celulele au fost incubate 20 de minute pe gheață, ferite de lumină. După incubare, celulele au fost spălate de două ori în 1mL de tampon de colorare înaintea re-suspensiei în tampon de colorare conținând 0.1μM DAPI (Sigma-Aldrich). Celulele au fost menținute pe gheață, ferite de lumină și analizate imediat. Dubletele s-au exclus folosind SSC-W vs SSC-A și s-a folosit DAPI pentru a exclude celulele moarte. Sortarea anticorpilor LGR5 s-a determinat pe baza colorării anticorpului de control negativ împotriva toxinei tetanice (MF1337). Fluorescența a fost detectată folosind un BD FACS Aria Fusion cu laser UV și filtru 450/50 pentru DAPI și laser verde cu filtrul 582/15 pentru a detecta fluorescența R-PE.

Îmbogățirea mARN LGR5 după sortare

Pentru a evalua dacă o colorare FACS LGR5 a îmbogățit celulele care exprimă LGR5, celulele au fost sortate cu filtru setat astfel încât primele și ultimele 15% dintre celulele colorate au fost izolate. S-au sortat în total 2000 celule în tampon de microprofilare (furnizat de IRB genomics) și celulele sortate au fost procesate de IRB genomics pentru extragerea ARN și sinteza cADN. Expresia LGR5 a fost evaluată folosind PCR cantitativă cu sonde TaqMan și TaqMan Universal PCR Master Mix (de la Applied Biosystems). S-a utilizat aparatul PCR în timp real StepOnePlus (Applied Biosystems) pentru efectuarea reacțiilor într-o placă cu 96 de godeuri optice transparente cu capace optice, conform instrucțiunilor producătorului. S-a evaluat expresia între fracțiunile LGR5 negative și pozitive folosind o sondă LGR5 (Hs00173664_m1) și s-a normalizat folosind expresia genei de control endogene B2M (Hs99999907_m1). S-au determinat diferențele expresiei genice țintă folosind software StepOne 2.2 plus.

Colorarea P18 pentru LGR5 și sortarea populației LGR5 pozitive și negative și diferențele de creștere între cele două

Celulele au fost colorate așa cum s-a descris anterior și filtrele de sortare au fost setate astfel încât primele și ultimele 15% dintre celulele colorate au fost sortate în 200μL de mediu de cultură conținând Primocin (Invitrogen). Numărul celulelor sortate s-a determinat pe baza numărului de evenimente sortate FACS. După sortare, celulele au fost centrifugate și așezate în plăci la o densitate de 2000 celule/25μL de BME. S-au numărat manual organoidele formate după două săptămâni folosind un microscop optic inversat.

Tratamentul organoidului P18T cu anticorpi bispecfici EGFRxLGR5

Pentru experimentele de tratamente cu anticorpi, mediul de cultură a fost modificat și nu a conținut Gastrin sau PGE2 și avut o concentrație redusă de EGF (2.5ng/mL). După descompunerea organoidelor, s-a folosit colorare cu Trypan (Sigma-Aldrich) pentru a determina numărul celulelor vii și 5000 de celule au fost așezate/25 μL de BME într-o placă de cultură tisulară cu 48 de godeuri. Fiecare tratament a avut 8 reproduceri tehnice și s-a cultivat în 250μL de mediu/godeu. La trei zile după însămânțarea celulelor individuale, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu mediu conținând tratamente cu anticorpi (2μg/mL). La 7 zile după adăugarea anticorpilor, placa a fost scanată folosind Olympus ScanR cu obiectiv optic x4 și numărul organoidelor s-a cuantificat folosind ImageJ cu macro proiectat de IRB.

Experimentul a fost repetat de trei ori și s-a efectuat un T-test bilateral, cu probe împerecheate pentru a evalua diferențele semnificative între tratamente.

Izolarea ARN și analiza Q-PCR a nivelurilor mRNA LGR5 și CK20

După scanarea plăcilor de cultură tisulară ale tumoroidelor tratate în vederea cuantificării, tumoroidelor au fost izolate folosind soluție de recuperare celulară și incubate pe gheață 1 oră. Tumoroidelor au fost apoi centrifugate și re-suspendate în 1 mL de kit de purificare ARN TRIzol® Plus (Life Technologies) și s-a extras ARN total. După separarea fazelor cu cloroform, faza apoasă superioară s-a amestecat cu 70% etanol și s-a spălat prin coloane RNA (PureLink™ RNA Mini kit, Life Technologies) conform protocolului furnizat de producător. ARN a fost cuantificat folosind un spectrofotometru Nanodrop. ARN a fost transcris invers în cADN folosind kitul cADN de mare capacitate (Applied Biosystems). S-a folosit PCR cantitativă în timp real cu sonde TaqMan și TaqMan Universal PCR Master Mix (de la Applied

Biosystems) pentru cuantificarea nivelurilor LGR5 (Hs00173664_m1) și CK20 (Hs00300643_m1) de mRNA. S-au detectat diferențele de expresie genice țintă folosind metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ și software StepOne 2.2 plus.

Măsurarea ex vivo a nivelurilor de mRNA și proteină ale LGR5 și EGFR în modele PDX ale diferitelor indicații

mARN extras din tumori PDX crescute *in vivo* s-a folosit pentru a analiza nivelurile de expresie ale genelor LGR5 și EGFR prin secvențiere ARN (RNAseq). Datele din baza de date Crown Bioscience (<http://hubase2.crownbio.com>) sunt exprimate ca o conversie log 2 a fragmentelor per milion de kilobaze (FKPM): Tabel 9. În plus, celulele tumorale extrase din diferitele tumori PDX crescute *in vivo* au fost colorate cu 15μg/ml de PG5816 (anti-LGR5), PG3755 (anti-EGFR) și (control) PG1337 și anticorpul legat a fost detectat apoi cu IgG anti-uman marcat cu PE. Tabelul 10 indică intensitățile medii ale fluorescenței pentru toate colorările de anticorp în mai multe indicații de cancer.

Exemplul 2: Generarea grupurilor de anticorp direcționat către țintele căii WNT folosind selecții cu fagi

Imunizarea șoarecilor MeMo® cu cele patru ținte WNT diferite.

Șoarecii MeMo® au fost imunizați cu structuri de expresie care codifică LGR4 și LGR5 uman în lungime completă (pVax1_hLGR4-FLAG-HA și pVax1_hLGR5-FLAG-HA), cu domeniul extracelular al LGR4 sau LGR5 (pVax1_hLGR4(ECD)-GPA33-FLAG și pVax1_hLGR5(ECD)-GPA33-FLAG) sau cu proteine recombinante rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc (RND systems). Serurile de șoarece s-au analizat cu privire la dovada unui răspuns imun umoral direcționat către țintă. Un test pe bază de FACS a folosit linii celulare Freestyle 293F generate intern, care au supraexprimat stabil antigenul. Figura 6 indică un exemplu de date. Titrele IgG serice (definite ca cea mai mare diluție serică ce produce o colorare a liniei celulare Freestyle 293F care exprimă stabil ținta de cel puțin trei ori mai mare decât MFI a serului colectat înaintea imunizării) ale șoarecilor imunizați cu succes cu cele patru ținte WNT sunt indicate în Tabelul 1. Șoarecii care au prezentat un răspuns imun semnificativ și specific față de antigenul respectiv au fost scoși din studiu și s-au recoltat țesuturi limfoide ale acestor șoareci (ganglioni limfatici inghinali și spline). Din ganglionii limfatici obținuți, s-au generat repertorii de anticorpi fagici 'imuni' prin RT-PCR folosind

perechi de primeri specifici pentru IgG și VH și clonând grupul policlonal al cADN care codifică VH într-un fagemid pentru expresia fragmentelor Fab pe suprafața fagilor nelitici. Toate bibliotecile generate au avut o dimensiune de peste 10^6 clone (transformante individuale) și o frecvență a inserției de peste 80%.

Selecțiile fagilor pentru generarea anticorpilor cLC specifici țintei

Pentru a genera grupuri de anticorpi cLC direcționați către țintele hLGR4, hLGR5, hZNR3 și hRNF43, s-au aplicat rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNR3-Fc, rhRNF43-Fc (RND systems) sau ECD solubil al hRNF43 sau mZNR3 (preparat intern) pe un suport solid și repertoriile de anticorpi fagici cLC sintetici generați intern s-au testat cu privire la legarea de antigenele aplicate în prezența unui surplus de IgG uman (pentru a preveni selecția fagilor de legare Fc) așa cum se descrie în esență în Marks et al. (J. Mol. Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97). În paralel, s-au folosit pentru selecții repertoriile de anticorpi fagici 'imuni' preparați de la animale imunizate cu succes. Selecțiile pe proteina acoperită s-au efectuat în plăci de microtitru (NUNC, maxisorp) și selecțiile pe celule Freestyle 293F care au supraexprimat ținta s-au efectuat în soluție; eluarea fagilor legați s-a realizat cu un șoc pH folosind 100mM glicină (pH2) sau 100mM TEA (pH12). După o primă rundă de selecție folosind biblioteci de anticorpi fagici sintetici, grupul policlonal de clone selectate s-a folosit pentru prepararea fagilor și fagii au fost testați cu privire la legarea de același antigen sau au fost selectați pe celule Freestyle 293F generate intern care supraexprimă stabil antigenul respectiv. După o singură rundă (biblioteci imune) sau două runde (biblioteci sintetice) de selecție, s-au colectat clone individuale și s-au folosit pentru prepararea fagilor monoclonali care au fost testați cu privire la legarea țintelor în FACS folosind un amestec de două linii celulare: linia celulară Freestyle 293F mamă (antigen-negativă) și celule 293F Freestyle marcate cu DiD care au supraexprimat stabil ținta WNT. Clonele fagice care au recunoscut populația celulară (marcată cu DiD) antigen-pozitivă, și nu celulele antigen-negative, au fost considerate antigen-specifice și prin urmare au fost caracterizate în continuare. Figura 7 indică un experiment de testare a clonelor selectate cu privire la legarea antigenului specific de celule care exprimă ținta prin FACS.

Clonele care s-au dovedit specifice țintei au fost secvențiate și grupate pe baza identității lor secvențiale: un 'cluster' de clone de anticorp a fost definit ca un grup de anticorpi având aceeași utilizare a genelor V VH și o secvență HCDR3 și lungime HCDR3 identice (Figura 17). Aceste clone provin toate de la o singură clonă care s-a diversificat în timpul răspunsului imun *in vivo* la șoareci MeMo. Un 'super-cluster' a fost definit ca un grup de clone

având aceeași utilizare a genelor V_H și cel puțin 70% identitate secvențială a HCDR3 și aceeași lungime HCDR3. Deși această definiție este arbitrară, este probabil (dar nu dovedit) ca aceste clone să fi apărut de asemenea dintr-un singur precursor B celular care a fost selectat, activat și diversificat în timpul răspunsului imun umoral *in vivo*. Practic, se anticipează că clonele dintr-un supercluster leagă același epitop, deși cu afinități diferite și/sau poziție diferită pe epitop. S-au selectat cel puțin două clone per super-cluster (definit mai sus) pentru a intra în procesul de validare a clonelor, în care s-a confirmat legarea specifică de țintă și s-a verificat secvența clonei. Aceste numere se bazează pe clonele Fab al căror V_H are o utilizare a genelor din linia germinală și/sau secvență HCDR3 diferite. Clonele care au trecut de procesul de validare (i.e. pentru care s-a confirmat legarea și specificitatea pentru țintă și secvența a fost validată) s-au folosit pentru reclonarea genei V_H într-un vector de expresie pentru a produce și caracteriza IgG corespunzător. În total, s-au identificat 667 de anticorpi diferiți care au recunoscut specific una din cele patru ținte LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43, dintre care 288 au fost caracterizate în continuare (Tabel 2). Toate aceste clone au fost reclonate apoi în format IgG cLC bispecific format cu un braț Fab 'fals' (i.e. nerelevant, anti-TT) pentru a putea caracteriza interacțiunea monovalentă a brațului Fab direcționat către ținta WNT cu ținta sa.

Exemplul 3: Caracterizarea grupurilor de anticorpi.

Fragmentele Fab selectate (indicate cu codul MFnnnn) izolate din prezentarea fagilor au fost reclonate într-un vector de expresie IgG1 conținând mutații DEKK. În acest scop, cADN care codifică V_H s-a excizat din vectorul fagemid folosit pentru selectarea fragmentului de anticorpul și re-clonat în vector de expresie IgG1 conținând mutații DEKK (KK). Prin co-transfecție cu un construct de expresie conținând mutațiile DEKK (DE) complementare și care codifică un fragment Fab direcționat către antigenul de control fără legare toxoidul tetanic (TT: MF1337), s-au obținut IgG anti-WNTxTT bispecifici (WNT referindu-se la LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43). Grupul de IgG1 bispecifici cu activitate de legare monovalentă față de țintele WNT a fost produs, purificat și caracterizat cu privire la productivitate și specificitate. IgG bispecifici s-au produs la scară mică prin co-transfecție temporară a plasmidelor care codifică ambele fragmente Fab în celule Freestyle 293F prin combinarea diferitelor fragmente Fab care leagă brațul de țintire WNT (hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) în vectorul KK încărcat pozitiv cu fragmentul Fab de control direcționat către toxoidul tetanic în vectorul bispecific DE încărcat negativ. După producere, IgG bispecifici au fost purificați prin cromatografie de afinitate cu proteina A și tamponul a fost schimbat cu PBS. Producția reușită

a avut ca rezultat un anticorp IgG1 în lungime completă, cu o concentrație minimă de 0.1 mg/ml, căruia i s-a alocat un cod unic (PBnnnnn; unde nnnnn reprezintă un număr generat aleatoriu) pentru identificarea combinației specifice a 2 fragmente Fab de legare a țintelor diferite.

IgG bispecifici produși cu succes au fost testați cu privire la legarea de ținte în ELISA și FACS. ELISA s-a efectuat folosind rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc la 2 μg/ml sau toxoid tetanic la 2 5 μg/ml ca strat de acoperire. IgG au fost testați la o singură concentrație de 5 μg/ml. Se consideră că IgG se leagă de rhLGR4-Fc, rhLGR5-Fc, rhZNRF3-Fc sau rhRNF43-Fc când semnalul OD_{450nm} observat este de cinci ori peste fond (semnal OD_{450nm} al anticorpului de control negativ). În plus, o analiză FACS a IgG bispecifici direcționați către TT și una din cele patru ținte WNT (hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) s-a efectuat pentru a determina legarea specifică de ținta lor WNT. Analiza FACS s-a efectuat folosind o colorare DiD, amestecând celule Freestyle 239F nemarcate (DiD-) cu celule Freestyle 293F antigen-pozitive marcate (care exprimă hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) (DiD+). IgG bispecifici au fost testați întotdeauna în paralel pe două amestecuri de celule cu privire la specificitate. IgG bispecifici conținând un fragment Fab direcționat către LGR4 sau LGR5 s-au testat pe celule Freestyle 293F care supraexprimă hLGR4 și hLGR5 (în amestec cu celule Freestyle 293F antigen-negative) și anticorpii de legare ZNRF3 și RNF43 s-au testat pe celule Freestyle 293F care supraexprimă hZNRF3 și hRNF43 (în amestec cu celule Freestyle 293F antigen-negative). S-a considerat că IgG bispecifici se leagă specific de hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43 când MFI al populației antigen-pozitive (celule Freestyle 293F care exprimă stabil hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) este de cinci ori mai mare decât MFI a populației antigen-negative (celule Freestyle 293F). S-a constatat că 41 din 66 de fragmente Fab LGR4, 69 din 84 de fragmente Fab LGR5, 92 din 105 de fragmente Fab ZNRF3 și 29 din 33 de fragmente Fab RNF43 se leagă specific de ținte (hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) în format bispecific (Biclonics®) în FACS și ELISA sau, în câteva cazuri, numai în FACS (fragmente Fab de legare hLGR4).

Caracterizarea grupului de anticorpi bispecifici

IgG bispecifici monovalenți confirmați că se leagă specific de LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43 uman au fost caracterizați în continuare cu privire la afinitate, stabilitate, capacitatea de blocare R-Spondin3 și reactivitatea încrucișată a ortologilor murini, după care s-a efectuat o altă subselecție.

Analiza FACS de titrare a afinității

Anticorpul de legare au fost titrați în FACS limitată pentru a-i clasifica în funcție de afinitate. IgG monovalenți direcționați către hLGR4, hLGR5, hZNRf3 sau hRNF43 (în combinație cu fragmentul Fab al toxoidului tetanic) pe suprafața celulelor Freestyle 293F care supraexprimă hLGR4, hLGR5, hZNRf3 sau hRNF43. Fiecare IgG a fost testat pe linia celulară Freestyle 293F corespunzătoare. S-a testat o serie de diluție 2x de IgG (5 μg/ml - 0,08 μg/ml) pe un număr fix de celule (5×10^5 celule/godeu) care exprimă stabil țintele WNT. Intensitatea medie a fluorescenței (MFI) din fiecare măsurătoare individuală a fost determinată prin FlowJo (software BD de analiză FACS). Pentru fiecare IgG, valorile MFI au fost reprezentate față de concentrația anticorpului și, din aceste curbe, s-a calculat zona de sub curbă (AUC). Pe baza valorilor AUC, s-a efectuat o clasificare a IgG bispecfici per țintă. Un exemplu al datelor folosite pentru clasificarea de afinitate este indicat în Figura 8.

Reactivitatea încrucișată a ortologilor murini ai anticorpilor selectați

Pentru a defini alte caracteristici de legare ale IgG bispecfici, s-a determinat reactivitatea încrucișată a ortologilor murini. Constructele care exprimă ortologii murini ai mLgr5, mZNRf3 și mRNF43 (pEF1_mLgr5-Myc-HIS, pDisplay_mZnrf3-Myc-PDGFR(TM), pDisplay_mRnf43-Myc-PDGFR(TM)) au fost transfectate temporar în celule HEK293T. S-au folosit IgG monovalenți la o concentrație de 5 μg/ml pentru colorare și legarea IgG s-a analizat prin FACS. S-a considerat că IgG bispecfici reacționează încrucișat dacă intensitatea medie a fluorescenței (MFI) a crescut de două ori față de celule Freestyle 293F netransfectate. 92 din 92 de IgG anti-ZNRf3 au reacționat încrucișat cu mZnrf3; 9 din 29 de IgG anti-RNF43 au reacționat încrucișat cu mRnf43 și 18 din 69 IgG anti-LGR5 IgG au reacționat încrucișat cu ortologul Lgr5 murin. Reactivitatea încrucișată a mLgr4 a fost testată în ELISA pe proteine rmLgr4-Fc (RND systems). S-a considerat că IgG bispecfici reacționează încrucișat cu cross dacă OD_{450nm} a fost 5x peste fond (semnalul OD_{450nm} al anticorpului de control negativ). IgG au fost testați cu privire la legare la o singură concentrație de 5 μg/ml de rmLgr4-Fc și verificați cu privire la reactivitatea încrucișată. 36 din 41 IgG anti-LGR4 au fost testați pozitiv pentru reactivitate încrucișată cu mLgr4.

Blocarea R-Spondin

Toți IgG bispecfici au fost testați în ELISA de blocare a ligandului pentru a testa dacă anticorpii care țintesc LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43 pot perturba legarea R-Spondin3. Legarea proteinelor de fuziune Fc ale domeniului extracelular al celor patru ținte WNT de R-Spondin3 s-a testat în prezența unui surplus de IgG bispecfici direcționați către LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43. Pentru testarea IgG bispecfici direcționați către ținte diferite cu privire la capacitatea de a bloca interacțiunea proteinei de fuziune Fc cu rhR-Spondin3, s-au testat în ELISA de blocare. IgG s-au testat folosind o singură concentrație de IgG de 15μg/ml.

S-a considerat că aceste clone blochează atunci când, în două teste independente, a fost redus cel puțin 50% din semnalul OD_{450nm}. Când a fost redus numai 20-50% din semnalul OD_{450nm}, s-a considerat că aceste clone blochează parțial. Un subset de IgG care țintesc ZNRF3 (48) și RNF43 (10) și grupul LGR4 (41) și Lgr5 (69) complet a fost testat cu privire la capacitatea de blocare R-Spondin. Au prezentat blocarea pentru LGR4 3 și blocare parțială pentru 5. Pentru ZNRF3, s-au identificat 1 blocator și 1 blocator parțial. Pentru RNF43 s-au identificat 3 blocatori și 2 blocatori parțiali, toți aparținând de 2 superclustere diferite. Pentru grupul LGR5, s-au identificat 10 IgG care au blocat parțial legarea R-Spondin3. Un exemplu al datelor generate în testul de blocare R-Spondin3 este indicat în Figura 9.

Măsurarea stabilității anticorpului la 40°C

Pentru a obține o indicație privind stabilitatea IgG bispecfici, toți IgG au fost incubați în mediu conținând ser la 40°C 1 săptămână și legarea lor în ELISA s-a comparat cu cea a anticorpilor bispecfici incubați în același mediu la 4°C. După 1 săptămână, IgG s-au folosit într-un screening ELISA pentru a determina dacă au reținut legarea de țintă. Legarea s-a determinat prin procentajul de semnal OD_{450nm} pierdut după incubare de o săptămână la 40°C comparativ cu incubare săptămână la 4°C. Cei mai mulți IgG s-au testat de două ori; când un IgG a reținut cel puțin 50% din legare în două teste independente, a fost considerat stabil. Când în cele două experimente stabilitatea a variat, acești IgG s-au considerat parțial stabili, iar când IgG au reținut de două ori mai puțin decât 50% legare, s-au considerat instabili. Pentru LGR4, 12 din 41 IgG au reținut legarea (7 parțial stabili, 2 nedeterminat; nu s-au legat în ELISA), pentru LGR5 38 din 69 IgG au reținut legarea (7 parțial stabili), pentru ZNRF3 28 din 92 IgG au reținut legarea (10 parțial stabili) și pentru RNF43 10 din 29 IgG au reținut legarea (9 parțial stabili).

Clasificarea și selecția IgG bispecifici

După încheierea caracterizării, datele au fost colectate și s-a realizat o clasificare pe baza tuturor datelor obținute. Selecția fragmentelor Fab care ținesc Wnt pentru testul funcțional s-a efectuat după cum urmează: s-au selectat IgG bispecifici care au reținut legare de cel puțin 50% la 40°C. S-au selectat apoi cei cu legare de cea mai mare afinitate. Această selecție a conținut lianți cu caracteristici diferite, de ex. reactivitate încrucișată cu ortologi murini sau capacitatea de blocare R-Spondin. În total, s-au selectat 54 de fragmente Fab bispecific direcționate către cele patru ținte WNT diferite pentru screening funcțional; pentru LGR4 s-au selectat 10 din 41 fragmente Fab, pentru LGR5 17 din 69 fragmente Fab, pentru ZNRF3 18 din 92 fragmente Fab și pentru RNF43 9 din 29 fragmente Fab (Tabele 3).

Generarea grupului pentru screening funcțional

Fragmentele Fab care ținesc WNT selectate împotriva hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43 s-au folosit pentru generarea unui grup mare de anticorpi bispecifici (>500 bispecifici). Fragmentele Fab care ținesc WNT selectate s-au combinat cu fragmente Fab de legare a tirozin kinazei receptoare (RTK) într-un grup de IgG bispecifici produși și purificați. Fragmentele Fab specifice pentru EGFR și HER3 selectate blochează activarea receptorului în teste pe bază de celule și nu afectează funcționalitatea altor fragmente Fab când se combină în format bispecific. S-au folosit patru fragmente Fab EGFR MF3755, MF4280, MF3370 și MF4289, precum și patru fragmente Fab HER3 MF3178, MF3176, MF3125 și MF4863 în combinație cu fragmentele Fab care ținesc WNT selectate (vezi Tabelul 5 pentru o subselecție a grupului produs).

Fragmentele bispecifice au fost produse prin coexpresia vectorilor IgG în care brațul WNT a fost exprimat pe lanțul greu conținând mutația KK încărcată pozitiv și brațul RTK a fost exprimat pe lanțul greu conținând mutația DE încărcată negativ, purificate și validate cu privire la legarea țintei, specificitate și stabilitate. Grupurile de fragmente bispecifice care au trecut de controlul de calitate a legării și stabilității (QC) s-au folosit pentru screening funcțional (53 din 54 de fragmente Fab care ținesc WNT au trecut de QC). Grupul de >500 de anticorpi bispecifici purificați și validați care ținesc una din cele patru ținte WNT (hLGR4, hLGR5, hZNRF3 sau hRNF43) și un fragment Fab EGFR sau HER3 sau toxoid tetanic ca un fragment Fab de control negativ simulat s-au analizat cu privire la activitatea față de organoide provenite de la pacienți în testele de screening funcțional descrise mai jos.

Exemplul 4: Screeningul funcțional al anticorpilor bispecfici în organoide de colon

Organoidale de colon provin din celule stem (canceroase) LGR5-pozitive crescute în mediu de amplificare conținând factor de creștere care permite formarea structurilor epiteliale de colon care formează un lumen funcțional (Sato et al. 2011 Gastroenterology 141:1762-1772). Creșterea organoidelor, dezvoltarea și formarea lumenului depinde de fondul genetic al celulelor de cancer colorectal și de răspunsul la factorii de creștere care stimulează creșterea, factorul de creștere epidermic (EGF) sau Neuregulin-1 (NRG)/ Heregulin (HRG). Deși morfologia tumoroidelor CRC de la pacienți diferiți se deosebesc în mare măsură, profilul morfologic este consecvent între tumoroidale de aceeași origine și sunt genetic aproape identice cu tumoarea inițială din care provin. Analiza cantitativă cu conținut mare a imaginilor organoidelor CRC cultivate poate deosebi așadar organoide CRC de la pacienți diferiți și se poate folosi de asemenea pentru a măsura modificările morfologice asociate cu activarea căilor de semnalizare - de ex. activate de liganzii pentru receptori HER, de ex. EGF și HRG. În mod similar, se poate măsura inhibarea acestor răspunsuri de anticorpi de blocare sau alte molecule terapeutice. Analiza pe bază de imagini permite măsurarea modificărilor morfologice care pot fi independente de proliferarea celulară, furnizând informații suplimentare cu privire la activitatea compusului față de cele obținute din teste de proliferare convenționale.

Modificările fenotipice induse de compus formează așadar baza screeningului funcțional al anticorpilor în organoide CRC.

Anticorpii bispecfici dezvoltați țintesc EGFR sau HER3 în combinație cu țintirea proteinelor exprimate pe suprafața celulară asociate cu semnalizarea WNT LGR4, LGR5, RNF43 sau ZNRF3. Sistemul de screening este prevăzut să monitorizeze inhibarea excrescențelor tumoroidale datorită activității anticorpilor bispecfici. Aceasta se poate folosi atât pentru selecția organoidelor (și profilului molecular asociat) care sunt sensibile la inhibarea țintită a căilor specifice, precum și pentru selecția moleculelor noi active în organoide.

Selecția modelelor de tumoroid de colon

Modelele de tumoroid de colon folosite pentru teste s-au selectat pe baza demonstrării modificărilor morfologice în răspuns la EGF, HRG sau WNT3A. Răspunsurile morfologice la acești factori s-au investigat într-un grup de 20 de tumoroidale de la pacienți diferiți (Van de Wetering et al. 2015 Cell 161:933-45). Mai întâi, tumoroidale au fost amplificate, împărțite și reînsămânțate în plăci cu 384 de godeuri pentru a analiza și documenta morfologia de bază după 1 săptămână de creștere. Apoi, aceleași 20 de tumoroidale s-au testat cu privire la răspunsul

la factorii de creștere, EGF sau HRG, sau fără factor de creștere prezent în mediul de amplificare. În acest scop, toate cele 500 de caracteristici morfologice au fost analizate și s-au măsurat modificările induse de factorii solubili. S-a selectat un set de caracteristici pentru fiecare organoid care a permis măsurarea răspunsului la factor de creștere și distingerea între culturi de tumoroid dependente de factori de creștere și culturi de tumoroid independente de factori de creștere (vezi Tabelul 4). Aceasta a demonstrat că nu a fost suficientă o singură caracteristică pentru cuantificarea optimă a răspunsurilor în organoide CRC diferite. Pe baza acestor date s-au selectat următoarele linii tumoroid: P18T (APC^{mut}), care este foarte dependentă de semnalizarea EGFR pentru creștere și formarea structurilor de lumen ramificate în tumoroid; P14T (APC^{mut}, SMAD4^{mut}), care prezintă efecte clare de modificare morfologică la semnalizare și inhibare EGFR și HER3; P19Tb (APC^{wt}, dar mutant PIK3CA, TP53, BRAF, ARID1A, ARID2, ERBB3, POLE și RNF43) ca un model tumoroid fără mutații APC și așadar dependent de WNT3A pentru amplificare; în sfârșit, P26T (APC^{mut}, KRAS^{mut}, TP53^{mut} și CTNNB1^{mut}) ca un model care nu prezintă dependență de prezența factorilor de creștere pentru amplificare. În screeningul inițial al anticorpilor bispecfici, P26T nu a prezentat dependență de factori de creștere și nici sensibilitate la anticorpi care țintesc receptori ai factorilor de creștere și a fost eliminat din screening.

Identificarea fragmentelor Fab funcționale în anticorpi bispecfici

Pentru identificarea anticorpilor bispecfici funcționali capabili să modifice caracteristicile morfologice ale tumoroidelor de colon, s-au comparat cu condițiile de creștere fără stimulare EGF și cu efectul compușilor de inhibare a semnalizării EGFR/MAPK (de ex. Cetuximab și Trametinib) în condiții de creștere EGF. Anticorpilor bispecfici funcționali au fost definiți prin capacitatea lor de a limita amplificarea tumoroidă în condiții EGF în direcția profilului morfologic obținut de inhibitorii semnalizării EGFR/MAPK și/sau omițând EGF din mediul de cultură. Fragmentele Fab care țintesc WNT care au permis efectul brațului de țintire EGFR sunt cele care au prezentat capacitate de inhibare a creșterii mărită semnificativ față de fragmentul Fab monovalent echivalent de țintire (EGFRxTT bispecific).

Anticorpilor bispecfici care au țintit doar LGR4, LGR5, ZNRF3 sau RNF43 (în combinație cu fragmentul Fab de toxoid tetanic (TT)) s-au comparat cu morfologia controlului negativ în mediu fără factor de creștere (P19Tb) sau mediu conținând EGF sau HRG (P18T și P14T) pentru a căuta efectele posibile ale țintirii doar a receptorilor semnalizării WNT.

Anticorpul bispecific prezentând fragmente Fab care țintesc HER3 s-au comparat funcțional cu condiții de creștere fără stimulare HRG sau efectul anticorpilor care țintesc HER3 și inhibitorul PI3K în condiții HRG; anticorpul bispecific funcțional care inhibă HER3 au fost definiți ca cei care au inhibat răspunsul de creștere stimulat de HRG în aceeași direcție în spațiul euclidian precum inhibitorul kinazic MEK, Trametinib, fără condiții de creștere HRG și/sau anticorpi de referință care țintesc HER3. Fragmentele Fab care țintesc WNT care au permis efectul brațului de țintire HER3 cu privire la efectul de inhibare a creșterii comparativ cu bispecificul monovalent echivalent HER3 au fost considerate fragmente Fab de țintire candidat.

Selecția primară a candidaților de anticorp bispecific

Anticorpul bispecific care, în prezența EGF, au indus o modificare a morfologiei tumoroidelor de colon P14T și P18T care se apropie de, corespunde sau depășește fenotipul în absența factorilor de creștere sau prezența inhibitorilor EGFR/MAPK de referință, au fost identificați ca posibili candidați. În mod similar cu condiții EGF, anticorpul testat în condiții de cultură HRG au fost marcați pentru monitorizare dacă efectul s-a apropiat, a corespuns sau a depășit distanța controlului negativ a condițiilor fără factor de creștere și/sau inhibitorilor HER3/PI3K de referință. Pentru P19Tb, relativ insensibil la tratamentul cu factor de creștere, selecția anticorpilor funcționali s-a bazat pe calculul distanței de la controlul negativ marcat de profilul morfologic indus de Trametinib și inhibitorul PI3K CH5132799.

Grupurile bispecifice au fost analizate în 3 tumoroide de colon diferite (P18T, P14T și P19Tb). Grupul de anticorpi a testat combinațiile a patru fragmente Fab de țintire EGFR diferite, patru fragmente Fab de țintire HER3 diferite și un fragment Fab anti-toxoid tetanic (control negativ) cu 53 de fragmente Fab care țintesc WNT diferite și un fragment fab de țintire TT. Fiecare anticorp bispecific a fost evaluat cu privire la capacitatea de a inhiba excrescența tumoroidă. Nici una din combinațiile de fragmente TT/WNT nu a inhibat excrescența tumoroidă (0/53). În grupul fragmentelor Fab care țintesc EGFR, fragmentul Fab MF3755 a fost cel mai potent: 22/53 combinații de fragmente Fab MF3755/WNT bispecifice au inhibat dezvoltarea tumoroidă. Fragmentul de țintire EGFR clasat al doilea a fost MF4280 cu 4/53 combinații de fragmente Fab EGFR/WNT inhibitorii active. O combinație (1/53) de fragmente Fab bispecifice de țintire EGFR MF3370/WNT a prezentat activitate de inhibare și nici una (0/53) din combinațiile de fragmente Fab bispecifice de țintire EGFR MF4289/WNT nu a limitat semnificativ excrescența tumoroidă. În grupul anticorpilor bispecific conținând fragmente Fab de țintire HER3, fragmentul Fab MF3178 în combinație cu fragmentele Fab

care țintesc WNT a fost cel mai potent: 19/52 combinații MF3178/WNT au inhibat excrescența tumoroidă. Al doilea fragment Fab de țintire HER3 a fost MF4863 cu 6/53 anticorpi bispecfici MF4863/WNT activi. Anticorpul bispecific conținând fragmentele Fab de țintire HER3 MF3125 (0/53) și MF3176 (0/52) nu au prezentat inhibare semnificativă a excrescenței tumoroidale.

În clasificare, fragmentele Fab de țintire RTK care s-au combinat cel mai potent în format IgG bispecific cu fragmente Fab de țintire WNT au fost MF3755 ca fragment Fab de țintire EGFR și MF3178 ca fragment Fab de țintire HER3. Fragmentele Fab de țintire LGR4 MF5777 și MF5781, fragmentele Fab de țintire LGR5 MF5790, MF5803, MF5814, MF5816, MF5817 și MF5818, fragmentele Fab de țintire RNF43 MF5832 și MF5836 și fragmentele Fab de țintire ZNRF3 MF5850, MF5853, MF5855, MF5884 și MF5888 au fost identificate ca posibili candidați pentru testul de validare pe baza efectului lor funcțional asupra morfologiei tumoroidelor P18T, P14T și P19Tb în combinație cu fragmente Fab de țintire RTK în format IgG bispecific. Fragmentele Fab de țintire LGR4, LGR5, RNF43 și ZNRF3 s-au combinat cu fragmentele Fab de țintire EGFR MF3755, fragmentele Fab de țintire HER3 MF3178 sau fragmentele Fab de non-țintire TT MF1337 și s-au produs în loturi noi pentru confirmarea activității în testul de validare.

Testul de validare a anticorpilor RTK/WNT bispecfici

Dat fiind că anticorpul bispecific RTK/WNT candidat au prezentat activitate posibil relevantă din punct de vedere terapeutic în EGF și în condiții de cultură HRG, testul de validare a anticorpilor bispecfici candidat s-a efectuat în două condiții de factor de creștere: 5ng/ml EGF sau 5ng/ml HRG. Controlul a inclus godeuri care au primit mediu de cultură fără EGF sau HRG. Un alt control folosit în condiții de factor de creștere: Cetuximab (EGFR), PG3755 (EGFR/EGFR), Trametinib (MEK), CH5132799 (PI3K), PG3178 (HER3/HER3), PG2863 (HER3/HER3), PG3794 (HER3/EGFR) și PB4522 (HER3/EGFR). PG1337 (TT/TT) a avut rol de anticorp de control negativ și a fost denumit control negativ, împreună cu godeuri care au primit volume egale de DMSO sau PBS ca godeuri tratate cu compus, respectiv anticorp. Testul de validare a 46 de anticorpi bispecfici s-a efectuat în 24 de tumoroid de colon de la pacienți diferiți, în duplicat sau cvadruplicat. Setul liniilor de tumoroid de colon testate a constatat din 3 probe dependente de factor de creștere descrise în Van de Wetering et al. (2015 Cell 161:933-45): P18T, P14T și P8T și 2 probe independente de factor de creștere, P19Tb și P28N. S-a analizat un set nou de 19 tumoroid de colon: 10 linii primare de tumoroid de colon dependente

de factor de creștere, 5 linii primare de tumoroid de colon independente de factor de creștere și 4 linii de tumoroid de colon metastatice (dependente de factor de creștere). Analiza candidaților de anticorpi bispecfici din grupul de 24 de linii de tumoroid de colon de la pacienți diferiți a arătat că dependența de factor de creștere pentru excrescența tumoroidă poate identifica inhibarea tumorală mediată de fragmentul Fab de țintire RTK. Pragul de identificare a anticorpilor funcționali de inhibare a tumorii de colon în testul de validare a anticorpilor bispecfici a fost calculat prin normalizarea profilului morfologic pe o scară de 0 (fenotip egal cu un un profil de creștere complet inhibat) și 1 (fenotip similar cu controlul negativ). De fiecare dată când un anticorp individual, la o anumită doză, într-o anumită linie de tumoroid a avut un punctaj mai mic de 0.5, acest tratament cu anticorp a fost marcat ca prezentând inhibare a dezvoltării tumorii. S-au punctat datele în care un anticorp, la o anumită doză în EGF sau în condiții HRG, a prezentat inhibare și s-au exprimat ca un procentaj al numărului de godeuri tratate pentru acea condiție. Acest procentaj s-a calculat în toate cele 24 de linii de tumoroid de colon testate.

Testul de validare în 24 de tumoroide de colon a indentificat patru fragmente Fab de țintire LGR5 și 2 fragmente Fab de țintire RNF43 care au permis inhibarea dezvoltării tumorale mediată de fragmentele Fab RTK: MF5816, MF5814, MF5818 și MF5790 ca fragmente Fab de țintire LGR5 și MF5832 și MF5836 fragmente Fab de țintire RNF43. Primul anticorp clasificat a fost anticorpul bispecific EGFR/LGR5 PB10651 alcătuit din fragmentele Fab de țintire MF3755 și MF5816: Figura 10. În condiții HRG, primul anticorp clasificat a fost anticorpul bispecific HER3/LGR5 PB10748 alcătuit din fragmentele Fab de țintire MF3178 și MF5816. Aceasta a arătat că, în două condiții de factor de creștere independente și în combinație cu două fragmente Fab de țintire RTK diferite, fragmentele Fab de țintire LGR5 MF5816 sunt cele mai potente fragmente Fab care țintesc WNT care măresc țintirea RTK. MF5816 combinat cu MF3755 în PB10651 adaugă un alt nivel de inhibare tumorală prin reducerea potență a creșterii și dezvoltării tumoroide, care poate fi observat prin pierdere suplimentară de formare a lumenului, dimuniare celulară și rotunjirea nucleilor. Aceste observații morfologice arată că anticorpul EGFR/LGR5 PB10651 blochează activ semnalizarea factorului de creștere epidermic și induce un răspuns de moarte celulară în celule tumoroide cu creștere perturbată: Figura 11. Acest fenotip morfologic nu a fost observat cu anticorpul de țintire EGFR Cetuximab, nici când MF3755 a fost format ca un IgG convențional.

Selecția anticorpului candidat principal

PB10651 (anticorp bispecific EGFR/LGR5 (alcătuit din fragmente Fab MF3755 și MF5816)) a fost selectat ca anticorp candidat principal în condiții de 5ng/ml EGF pentru următoarele caracteristici: PB10651 a prezentat efecte inhibitorii potente la doza de testare de 10μg/ml în 75% din 24 de modele de tumoroid de colon diferite; 2) 67% dintre godeurile tratate cu PB10651 la 10μg/ml (40/60) au prezentat peste 50% reducere a creșterii; 3) 52% (31 de godeuri din 59) au prezentat peste 50% reducere a creșterii la tratament cu PB10651 la 2μg/ml; 4) PB10651 a depășit Cetuximab (47% (56/119) la 10μg/ml și 29% (35/119) la 2μg/ml) și anticorpul de referință EGFR/TT PB9919 (27% (16/60) la 10μg/ml și 5% (3/60) la 2μg/ml).

PB10647 (EGFR/LGR5 MF3755xMF5814) este al doilea anticorp candidat care a inhibat 54% din cele 24 de modele de tumoroid diferite (13/24) la 10μg/ml și s-a observat peste 50% reducere a creșterii în 52% din godeurile expuse (31/60) la 10μg/ml și în 37% (22/60) la 2μg/ml.

Alți anticorpi EGFR/LGR5 sunt PB10659 (MF3755xMF5818), eficienți în 50% din cele 24 de modele de tumoroid (12/24), 50% din godeurile expuse cu PB10659 la 10μg/ml au prezentat inhibare (30/60) și 32% (19/60) la 2μg/ml. PB10627 (MF3755xMF5790) a fost activ în 42% din tumoroid (10/24) și a prezentat reducere la 10μg/ml în 39% dintre godeuri (23/59) și la 2μg/ml în 33% dintre godeuri (20/60). PB10631 (MF3755xMF5803) a fost activ în 33% dintre tumoroid (8/24) și inhibitor la 10μg/ml în 34% dintre godeuri (20/59) și în 12% (7/59) la 2μg/ml. PB10655 (MF3755xMF5817) a fost activ în 20% (5) din cele 24 de modele de tumoroid și a prezentat inhibare în 25% dintre godeuri (15/60) la 10μg/ml și 6/60 (10%) la 2μg/ml.

Anticorpul EGFR/LGR4 PB10619 (MF3755xMF5777) a fost activ în 29% (7/24) dintre modelele de tumoroid și a dus la inhibarea tumoroidului în 28% (17/60) godeuri la 10μg/ml și 15% (9/60) la 2μg/ml. Anticorpul EGFR/LGR4 PB10623 (MF3755xMF5781) a fost activ în 8 din cele 24 de modele de tumoroid (33%) și a inhibat la 10μg/ml în 30% dintre godeuri (18/60) și 10% dintre godeuri la 2μg/ml (6/60).

Anticorpul EGFR/RNF43 PB10661 (MF3755xMF5832) a fost activ în 13 din cele 24 de modele de tumoroid (54%) și a prezentat inhibare în 42% dintre godeuri (25/60) la 10μg/ml și 22% (13/60) la 2μg/ml doză de testare. Anticorpul EGFR/RNF43 PB10667 (MF3755xMF5836) a fost activ în 13/24 modele de tumoroid (54%) și a prezentat inhibare la 10μg/ml în 35% dintre godeuri (21/60) și la 2μg/ml în 20% dintre godeuri (12/60).

Anticorpii EGFR/ZNRF3 sunt: PB10675 (MF3755xMF5850), activ în 8/24 modele de tumoroid (33%) cu 35% dintre godeurile testate (21/60) prezentând peste 50% inhibare la 10μg/ml și 15% (9/60) la 2μg/ml; PB10695 (MF3755xMF5884) a fost activ în 37% dintre

modelele de tumoroid (9/24) și a prezentat inhibare în 34% (20/59) la 10μg/ml și 12% (7/59) la 2μg/ml; PB10679 (MF3755xMF5853) a inhibat dezvoltarea tumoroidă în 21% dintre modelele de tumoroid (5/24), 20% dintre godeuri la 10μg/ml (12/60); PB10703 (MF3755xMF5888) a fost activ în 5 din cele 24 de modele de tumoroid (21%) și a inhibat la 10μg/ml în 22% dintre godeuri (13/60) și la 2μg/ml în 12% dintre godeuri (7/59).

PB10748, anticorpul HER3/LGR5 alcătuit din fragmente Fab MF3178 și MF5816, este activ ca un anticorp de inhibare a tumoroidului stimulat de HRG în 62% dintre modele de tumoroid de colon testate (15/24), prezentând inhibare în 56% dintre godeurile expuse (67/120). PB10748 a depășit anticorpul de referință HER3/TT PB9215 (MF3178xMF1337) care a inhibat peste 50% din dezvoltarea tumoroidă stimulată de HRG în 34% (41/120) dintre godeurile expuse.

Alți anticorpi HER3/LGR5 sunt: PB10735 (MF3178xMF5814), activ în 11/24 modele de tumoroid (46%) și inhibitor în 43% dintre godeurile expuse (51/118); PB10756 (MF3178xMF5818) a fost activ în 8/24 (33%) dintre modelele de tumoroid și inhibitor în 37% dintre godeurile expuse (44/119); PB10715 (MF3178xMF5790) a fost activ în 12/24 (50%) dintre modelele de tumoroid și inhibitor în 42% dintre godeuri (49/117); PB10719 (MF3178xMF5803) a fost activ în 7/24 (29%) dintre modelele de tumoroid și inhibitor în 34% dintre godeurile expuse (40/119); PB10752 (MF3178xMF5817) a fost activ în 12/24 (50%) dintre modelele de tumoroid și inhibitor în 28% dintre godeuri (33/120).

Doi anticorpi HER3/RNF43 sunt: PB10764 (MF3178xMF5836), activ în 17/24 modele de tumoroid (71%) și inhibitor în 38% dintre godeurile expuse (46/120) și PB12336 (MF3178xMF5832), activ în 11/24 modele de tumoroid (46%) și inhibitor în 41% dintre godeurile expuse (49/120).

Doi anticorpi HER3/LGR4 sunt: PB10711 (MF3178xMF5781, activ în 62% dintre modelele de tumoroid (15/24) și inhibitor în 50% dintre godeurile expuse (59/119) și PB10707 (MF3178xMF5777), activ în 13 din cele 24 de modele de tumoroid testate (54%) și inhibitor în 41 din cele 120 de godeuri expuse (34%).

Anticorpul bispecific care țintesc HER3 și ZNRF3 sunt: PB10776 (MF3178xMF5853), activ în 11/24 (46%) dintre modelele de tumoroid expuse la HRG și inhibitor în 40% dintre godeurile expuse (48/120); PB10772 (MF3178xMF5850), activ în 12/24 modele (50%) și inhibitor în 39% dintre godeurile expuse (46/119); PB10780 (MF3178xMF5855), activ în 8/24 (33%) dintre modele de tumoroid de colon și 31% dintre godeurile expuse (37/119); PB10800 (MF3178xMF5888) a fost activ în 12/24 modele de tumoroid (50%) și inhibitor în 29% (34/119) dintre godeurile expuse.

Exemplul 5: Caracterizarea anticorpului candidat principal

Măsurarea afinității de legare a anticorpului bispecific folosind un test pe bază de celule.

După optimizarea protocolului de iodurare, s-a obținut o proteină PB10651 marcată cu o radioactivitate specifică de 40 GBq/pmol. Puritatea radiochimică a fost >99%, analizată prin precipitarea proteinei. În testul Lindmo, s-a observat numai o scădere minoră a imunoreactivității. Imunoreactivitatea ^{125}I -PB10651 față de EGFR și LGR5 s-a estimat >89% folosind celule CHO care exprimă EGFR sau LRG5. Rezultatele testului Lindmo sunt indicate în figura 12. Folosind măsurători de afinitate în stare constantă, K_D a ^{125}I -PB10651 față de celule CHO-LGR5 s-a măsurat la 0.86 ± 0.13 nM și K_D a ^{125}I -PB10651 față de celule CHO-EGFR a fost determinată la 0.22 ± 0.086 nM, K_D a ^{125}I -PB10651 față de celule DLD-1 a fost estimată la 0.18 ± 0.024 nM. Un exemplu al datelor este indicat în figura 13.

Reprezentarea epitopilor PB10651 prin analiză de mutagenză shotgun

Pentru reprezentarea epitopilor de pe EGFR și LGR5 recunoscuți de ambele brațe Fab prezente în PB10651, s-a folosit metoda de mutagenză shotgun. Reziduurile relevante pentru legarea ambelor brațe Fab de antigene au putut fi determinate clar. Mutațiile care au anulat legarea PB10651 de EGFR sau LGR5 și care nu au inhibat legarea anticorpilor de control (identificând reziduurile relevante) sunt indicate în Tabelul 8. Aceste date arată recunoașterea de către brațul Fab anti-EGFR a domeniului III pe o regiune care se suprapune parțial cu situsul care intră în mod normal în contact cu ligandul EGF (Ogiso et al., 2002). Aceasta indică faptul că PB10651 poate bloca direct interacțiunea ligand-EGFR. Epitopul este indicat în structura EGFR (referință pdb 1YY9) în Figura 14. S-a arătat că brațul Fab care recunoaște LGR5 recunoaște reziduurile situate în domeniul N-CAP și prima repetiție bogată în leucină (LRR). Reziduurile sunt indicate în Figura 15 în structura LGR5 în complex cu RSPO1 (referință pdb 4BSR, Peng et al., 2013).

Referințe:

Li S, Schmitz KR, et al., (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. Cancer Cell. Apr;7(4): 301-11.

Ogiso, H. Ishitani, R. et al., (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell, Vol. 110, 775-787.

Peng, W.C. de Lau W. et al., (2013) Structure of Stem Cell Growth Factor R-spondin 1 in Complex with the Ectodomain of Its Receptor LGR5. Cell Rep 27 ; 3(6) : 1885-1892.

Competiția pentru legare a brațului Fab anti-LGR în PB10651 cu ligandul R-spondin1 folosind un test pe bază de celule

Pentru a putea determina capacitatea brațului Fab anti-LGR5 prezent în PB10651 de a lega LGR5 în prezența ligandului R-spondin1, s-a efectuat un test pe bază celulară. EC50 pentru legarea anticorpului anti-LGR5 de legare a ligandului OMP88R20 (PG7711) de clona celulară care exprimă LGR5 s-a determinat la 50ng/ml (333pM) și s-a folosit această concentrație pentru determinarea competiției cu ligandul R-spondin1 pentru legare de LGR5. Figura 16 indică semnalul MFI (normalizat la semnalul MFI obținut în absența R-spondin1) al legării OMP88R20 de celule CHO-K1 care exprimă LGR5 măsurat în FACS în funcție de concentrația de R-spondin1 adăugat. Anticorpii bispecfici anti-(TTxLGR5) s-au testat apoi cu privire la capacitatea de legare a clonei celulare CHO care exprimă LGR5 în prezența concentrațiilor în creștere de R-spondin1. PG7711 a fost inclus ca un control pozitiv la 50ng/ml. Anticorpii bispecfici au fost testați mai întâi cu privire la legarea de clona celulară CHO care exprimă LGR5 într-un interval de concentrații pentru a determina EC50 pentru legare în FACS. S-a determinat EC50 de 156ng/ml pentru PB10286 conținând Fab MF5816 principal și 200ng/ml pentru PB10261 conținând MF5790. Ho Anticorpii bispecfici au fost testați însă la 100ng/ml pentru a compara aceleași concentrații ale Fab antigen-specifice în test sau PG7711 și posibil pentru a crește sensibilitatea testului. Figura 17 arată că Fab anti-LGR5 MF5816 nu a fost inhibat să lege LGR5, chiar și în prezența unui excedent molar mare (120x) al ligandului, în timp ce în același test legarea versiunii copiate a OMP88R20 a fost complet inhibată. În plus, s-a observat legare redusă a PB10261 (conținând brațul de țintire LGR5 MF5790), ceea ce demonstrează că testul poate distinge între Fab anti-LGR5 care blochează ligandul și care nu blochează ligandul. Nu s-au observat diferențe și competiție la utilizarea anticorpului anti-LGR5 de șobolan 1D9 în testul de blocare (Figura 17), demonstrând specificitatea interacțiunii.

Referință:

de Lau W, Barker N, et al., Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. 2011 Jul 4; 476 (7360): 293-7.

Capacitatea de blocare a ligandului a brațului Fab anti-EGFR al PB10651 folosind un test pe bază de celule.

Pentru a testa capacitatea Fab anti-EGFR al PB10651 de a bloca semnalizarea mediată de EGF, s-a folosit un test pe bază de celule. Figura 18 indică potențialul PG3755 de a bloca moartea mediată de EGF a celulelor A431 (testate conform metodei descrise de Gulli *et al.*,) comparat cu cel al cetuximab. Anticorpul blochează semnalizarea mediată de EGF cu un potențial is cel puțin egal cu cetuximab.

Referință:

Gulli, L.F., et al., Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ*, 1996. 7(2): p. 173-178.

Reactivitatea încrucișată a PB10651.

PB10651 a fost testat cu privire la reactivitatea încrucișată ortologilor de șobolan și macac ai ambelor ținte: EGFR și LGR5. Secvența cADN a LGR5 de macac obținută prin RT-PCR din cADN de macac a corespuns secvenței estimate din GenBank (referință XM_005571542). S-au folosit constructe care codifică structuri umane, precum și de șobolan și macac pentru o transfecție temporară a celulelor CHO-K1. Legarea anticorpului de celule care exprimă ortologul uman, șobolan sau macac s-a testat în FACS. Figura 19 indică graficele de intensitate medie a fluorescenței (MFI) obținute în FACS după colorare în funcție de concentrația de anticorp folosită pentru colorare. S-a determinat că atât brațul Fab care recunoaște EGFR, cât și brațul Fab care recunoaște LGR5 reacționează încrucișat cu ortologul de macac al țintei: valorile EC50 pentru legare nu au fost semnificativ diferite pentru legare de ortologul uman sau de macac. Într-un experiment similar, s-a evaluat reactivitatea încrucișată a ambelor brațe cu ortologul de șobolan. S-a constatat că PB10651 se leagă bine de ortologul de șobolan al LGR5, deși EC50 s-a deplasat cu aproximativ un log comparativ cu valoarea determinată pentru legarea LGR5 uman. Totuși, brațul Fab anti-EGFR a prezentat reactivitate încrucișată slabă (diferență 2 log în EC50) cu ortologul de șobolan al EGFR, anticorpul fiind astfel necorespunzător pentru modele *in vivo* de șobolan sau studii de toxicitate pe șobolani.

Ca un control pozitiv pentru reactivitatea încrucișată a LGR5 de macac, s-a folosit versiunea copiată a hu8E11v2 (PG7543). Cetuximab s-a utilizat ca un control pentru reactivitatea încrucișată a EGFR de macac.

Direcționarea LGR5 specifică la un organoid provenit de la pacienți

Pentru a demonstra că fragmentele Fab MF5816 și MF5814 se leagă de LGR5 exprimat pe suprafața organoidelor provenite de la pacienți, PG5816 și PG5814 (IgG monoclonal, bivalent) conținând fragmente Fab MF5816 sau MF5814 s-au folosit pentru a colora celulele individuale provenite din organoid P18T. Folosirea PG5816 a dus la colorarea a 53,6% dintre celulele provenite din tumoroid P18T și PG5814 a dus la colorarea a 52,5% dintre celulele provenite din tumoroid P18T, în comparație cu colorarea folosind anticorpul de control negativ direcționat către TT (Figura 20).

Sortarea LGR5 îmbogățește celule care exprimă LGR5 și celule de inițiere a tumorii

În plus, pentru a arăta că fragmentele Fab de țintire LGR5 într-un format bispecific leagă LGR5 pe celule de tumoroid P18T, celulele au fost colorate cu anticorpi bispecfici PB10284 și PB10286 conținând fragmente Fab MF5814 sau MF5816 combinate cu fragmentul Fab anti-TT. După colorare, celulele au fost sortate folosind FACS și populațiile celulare colorate și necolorate au fost analizate prin Q-PCR privind nivelurile mRNA LGR5. Colorarea celulelor derivate din tumoroid P18T folosind anticorpi bispecfici conținând brațul Fab LGR5 MF5816 sau MF5814 a dus la îmbogățire de 6-14 ori a nivelurilor de expresie mRNA LGR5 în fracțiunea celulară LGR5-pozitivă sortată comparativ cu fracțiunea celulară LGR5-negativă: Figura 21.

În plus, aceste populații celulare din tumoroid P18T care exprimă LGR5 îmbogățite au permis o creștere de 4 ori a capacităților de formare a coloniilor: P18T s-a folosit pentru colorarea FACS și sortarea primelor (pozitive) și ultimelor (negative) 15% dintre celulele colorate identificate de anticorpii anti-LGR5: MF5814-TT, MF5816-TT și MF5790-TT. 2000 de celule s-au așezat în plăci în 25μL de BME în duplicat (reproduceri tehnice). După două săptămâni de creștere, organoidele au fost numărate manual folosind un microscop optic inversat. Rezultatele demonstrează că, în medie, anticorpii MF5814-TT, MF5790-TT și MF5816-TT îmbogățesc creșterea organoidelor, fracțiunile pozitive formând de 4.5, 3.7 și 7.1 ori mai multe organoide decât fracțiunile negative: Figura 22. Aceste date demonstrează o

îmbogățire clară pentru celulele de inițiere a tumorilor după sortarea celulelor LGR5-pozitive dintr-un organoid provenit de la un pacient.

Anticorpul bispecific LGR5xEGFR inhibă excrescența organoidelor provenite de la pacienți

Ca o modalitate independentă de măsurare a eficienței terapeutice a anticorpilor bispecifici anti-LGR5xEGFR, identificați în screeningul 3-D, organoidele au fost tratate cu diferiți anticorpi bispecifici și creșterea organoidelor s-a evaluat într-un test standard de formare a coloniilor după 7 zile: Figura 23. Imaginile indicate în dreapta figurii reprezintă un exemplu de imagini produse prin analiza macro și indică o picătură conținând organoide (cercuri negre). Experimentul s-a repetat de trei ori și s-a făcut media numărului și dimensiunii organoidelor între experimente. Aceste date se coroborează cu datele obținute folosind testul de validare a anticorpilor și arată că anticorpul bispecific LGR5xEGFR este inhibitor potenț al creșterii organoidelor obținute de la pacienți.

Tratarea organoidelor provenite de la pacienți cu anticorpi bispecifici LGR5xEGFR reduce puternic populația de celule nediferențiate.

După tratarea tumoroidelor șapte zile cu anticorp bispecific LGR5/EGFR, s-a folosit analiza PCR cantitativă în timp real pentru evaluarea efectelor anticorpilor asupra expresiei LGR5 și CK20 (un marker al diferențierii) (Figura 24). Rezultatele demonstrează că tratamentul cu anticorp EGFRxTT (MF3755xMF1337; PB9919) determină o creștere de 0.5 ori a nivelurilor mARN LGR5, reducând nivelurile de CK20 de 4 ori față de TTxTT. Anticorpul LGR5 MF5814xTT (MF5814xMF1337; PB10284) și MF5816-TT (MF5816xMF1337; PB10286) prezintă efecte reduse. Totuși, când brațul EGFR înlocuiește brațul TT, nivelurile LGR5 sunt reduse de 5.9 și 7.2 ori după tratament cu anticorpi MF5814xEGFR (MF5814xMF3755; LGR5xEGFR; PB10647) și MF5816-EGFR (MF5816xMF3755; LGR5xEGFR; PB10651). Expresia CK20 este de asemenea redusă de anticorpii PB10647 (EGFR/LGR5, MF5814xMF3755) și PB10651 (EGFR/LGR5, MF5816xMF3755) de 10.4 și 13.7 ori. Aceste date sugerează că, în această linie tumoroidă, adăugând un braț de țintire LGR5, creșterea relativă a nivelurilor mARN LGR5 determinată de inhibarea EGFR poate fi anulată, mărinde efectele inițiale ale inhibării EGFR (scăderea mARN CK20).

Tratarea organoidelor din tumori (tumoroide) și organoidelor din țesut normal cu PB10651.

Pentru a demonstra că PB10651 țintește selectiv tumoroide derivate din cancer de colon și nu organoide provenite din țesut de colon normal, culturile de organoide s-au incubat cu PB10651 afucozilat sau Cetuximab. Figura 26 indică dimensiunea organoidului (tumoroid) la dozajul anticorpului indicat. C51N este un organoid din țesut de colon normal. C1M este un organoid (tumoroid) din țesut canceros (Figura 26B). Figura 26A indică rezultatele unui organoid din țesut normal (C55N) și țesut canceros (C55T) de la același pacient. Figura 26C indică tabelul IC₅₀ pentru Cetuximab și PB10651 în 5 organoide din țesut normal, 3 tumoroide de cancer de colon primar și 3 tumoroide de cancer de colon metastatic. Raportul IC₅₀ Cetuximab: IC₅₀ PB10651 este indicat în ultima coloană din Figura 26C. Aceasta arată că PB10651 este de 20-200x mai potent decât Cetuximab în tumoroide, în timp ce efectul PB10651 în organoide normale este mai slab decât Cetuximab. Alte teste au demonstrat că prezența WNT sau R-Spondin în mediul de cultură nu a influențat eficiența Cetuximab sau PB10651 în inhibarea excrescenței tumoroidelor (nereprezentat).

Anticorpul care țintește LGR5 nu inhibă excrescența tumoroidă de colon

Pentru a verifica dacă este necesar aspectul bispecific al PB10651 pentru a obține capacitatea de inhibare a tumorii, PB10651 s-a comparat cu alți anticorpi care țintesc WNT produși de Genentech, Bionomics sau OncoMed (Tabel 7). În Figura 27, efectele anticorpilor care țintesc LGR5 (PG7709, PG7711, PG7712 și PG7543) asupra creșterii organoidelor se compară cu cele mediate de PB10651 și Cetuximab în modelele de tumoroid P18T și C1M. Rezultatele arată că nici unul dintre anticorpul comparativi nu inhibă excrescența tumoroidă de colon.

Anticorpul bispecific PB10651 este mai potent decât amestecul de anticorpi monospecifici, bivalenți, în inhibarea creșterii tumoroidelor

Anticorpul bispecific PB10651 este alcătuit dintr-un braț de țintire EGFR (MF3755) și un braț de țintire LGR5 (MF5816). Pentru a arăta că este necesară interacțiunea fizică între ambele brațe Fab pentru a obține efect potent de inhibare asupra tumoroidelor de colon, acestea s-au incubat cu doze în creștere de PB10651 (MF3755xMF5816; EGFRxLGR5), Cetuximab, PG3755 (MF3755xMF3755; EGFRxEGFR), PG5816 (MF5816xMF5816; LGR5xLGR5), PG1337 (MF1337xMF1337; TTxTT) și un amestec 1:1 de PG3755 cu PG5816. Figura 28A arată că tratamentul cu un amestec de anticorpi anti-LGR5 și anti-EGFR duce la inhibare a creșterii mai puțin potentă a tumoroidelor comparativ cu tratamentul cu anticorp bispecific

PB10651. În mod interesant, creșterea organoidelor normale a fost inhibată mai potent de amestecul de anticorpi anti-EGFR și anti-LGR5 decât de anticorpul bispecific. Aceste efecte sunt prezentate în tabelul IC₅₀ pentru alte modele de tumoroide și organoide normale în Figura 28B.

Studiile de localizare a PB10651 în tumoroide de colon indică un tipar de colorare intracelular specific

Pentru a arăta că anticorpul ajung la tumoroide când sunt încă însămânțați în hidrogel BME2 RGF, tumoroidele P18T de 7 zile au fost tratate 24 de ore cu anticorpul indicat (2 μg/ml), după care sunt fixați (15 minute, 4% paraformaldehidă) și permeabilizați (0.1% Triton-X100 și 0.5% BSA în PBS). Organoidele au fost apoi contracolorate cu FITC de capră anti-uman (Thermo Scientific, 1:3000). Nucleii și actina s-au colorat așa cum se descrie în (Di et al PlosOne 2014, PMID 25289886). Figura 29 arată că toți anticorpul pot pătrunde în gel și leagă toate celulele într-un tumoroid. Anticorpul care țintesc EGFR Cetuximab și PG3755 se localizează în membrana plasmatică, în timp ce PB10651 prezintă un tipar de colorare pătat intracelular, care nu se observă pentru nici unul dintre anticorpul LGR5 comparativi (PG7709, PG7711 sau PG7712).

Studiile de localizare a PB10651 în tumoroide de colon indică un tipar de colorare punctat intracelular juxtannuclear care se corelează cu sensibilitatea tumoroidului

Au fost incluse mai multe modele de tumoroide de colon și organoide în testul de contracolorare PB10651 și imagistică (vezi mai sus). Figura 30 arată că tiparul de colorare intracelular al PB10651 se observă în P18T, C0M, C55T (foarte sensibil la PB10651, IC₅₀ <1 μg/ml), în unele tumoroide C31M (moderat sensibile la PB10651), dar nu în tumoroidele insensibile la PB10651 (IC₅₀ >10 μg/ml) C28T, P8T sau P19Tb sau organoidele de colon normal C51N. Se observă în mod constant apariția petelor intracelulare juxtannucleare cu PB10651, independent de timpul de incubare a anticorpului (24 ore sau 7 zile), la concentrații mici ale anticorpului (50 ng/ml PB10651) și în formă conjugată cu Alexa-488.

Exemplul 6: Producerea și caracterizarea biochimică a PB10651

Generarea plasmidelor

Plasmidele pentru transfecție au fost generate din plasmide MV1453 și MV1626, vezi Figura 31. Aceste plasmide au fost digerate cu enzime de restricție SfiI și BstEII (MV1453) și enzime de restricție SfiI și XhoI (MV1626), după care VH MF3755 (digerate SfiI și BstEII) și MF5816 (digerate SfiI și XhoI) au fost ligate pentru a forma constructe MG3755C453 și MG5816C626. MV1622 codifică enzima RMD cu motiv Flag (Figura 32).

Producerea anticorpilor

Producerea proteinelor s-a efectuat prin transfecția temporară a celulelor Freestyle 293-F în suspensie (Invitrogen nr. cat. R79007) cultivate în mediu de expresie FreeStyle 293 (Gibco, nr. cat. 12338-018) suplimentat cu 2 mM L-Glutamină (Gibco, nr. cat. 25030-024) care s-au inhibat în reziduuri de fucoză de atașare de partea terminală a anticorpilor [Henning von Horsten et. al., Glycobiology, vol. 20, nr. 12, pp. 1607-1618, 2010]. Cu o zi înaintea transfecției, celulele au fost înșămânțate la o densitate de 5.0×10^5 celule/ml și incubate la 37°C, 8% CO₂, la o viteză de agitare de 155 rpm. Pentru transfecție, s-a preparat un amestec de ADN plasmidic și polietilenimină (PEI, MW 25,000 Da, Polysciences Inc., nr. cat. 23966) în mediu de cultură. Pentru un volum de transfecție de 25 mL, s-au amestecat 25 μg de ADN plasmidic fără endotoxină cu 62.5 μg PEI și 2.5 mL mediu de cultură. Amestecul a fost agitat, incubat 20 de minute la TC și adăugat în celule. Celulele au fost incubate la 37°C, 8% CO₂, la o viteză de agitare de 155 rpm 6 zile. Suspensia celulară a fost colectată, centrifugată la 1000g 10 min și supernatantul a fost colectat și centrifugat la 4000g 10 min.

Purificarea anticorpilor

Purificarea anticorpilor se efectuează legând anticorpul pe loturi de MabSelectSure LX (GE Healthcare) câteva ore la temperatura camerei. Anticorpul legat conținând MabSelectSure LX sepharose s-a transferat într-o coloană de curgere gravitațională. Coloana a fost spălată cu PBS, anticorpul a fost eluat folosind 100 mM tampon citrat pH 3.0 și pH-ul a fost neutralizat la 7.0 folosind 1M Tris pH 8.0. Probele au fost concentrate folosind filtre Vivaspin20 (Sartorius) 10 kDa și purificate prin filtrare în gel folosind o coloană Superdex200 26/600 (GE Healthcare) pre-echilibrată cu tampon PBS.

HPLC cu schimb de cationi

S-a folosit cromatografia cu schimb de cationi (CEX-HPLC) pentru a testa eterogeneitatea sarcinilor probelor de anticorp, precum și pentru a determina prezența și cantitatea de impurități asociate cu produsul (homodimeri și semicorpi). Experimentele s-au efectuat la temperatura ambiantă într-un sistem Dionex HPLC prevăzut cu o coloană SP STAT 7 μ m (Tosoh Biosciences) și un detector UV-vis. S-au injectat 10 μ g de probă în fiecare test. S-a aplicat un gradient de 25 mM tampon fosfat pH 6.0 cu concentrații NaCl în creștere de la 0 la 1 M pentru separarea anticorpilor. Datele au fost analizate folosind software Chromeleon.

Testul reporter ADCC

Activitatea anticorpului afucozilat PB10651 (MV1622) s-a testat pe celule reporter ADCC conținând varianta de receptor Fc γ RIIIa V158 (afinitate mare) sau varianta de receptor Fc γ RIIIa F158 (afinitate mică) (Promega). S-a adăugat o titrare în serie de anticorp, i.e. PB10651 afucozilat (PB10651-MV1622), PB10651 non-afucozilat și un IgG1 nedirecționat (PG1337) în combinație cu celule reporter ADCC incluzând variante Fc γ RIIIa cu afinitate mare și mică [Cartron et. al., Blood, vol. 99, nr. 3, pp. 754 -758, 2002;] Musolino et. al., Journal of Clinical Oncology, vol. 26, nr. 11, pp. 1789-1796] la celule A431, A549 și BxPC3. Activitatea ADCC s-a detectat măsurând activitatea luciferazei.

Parte experimentală

Celulele Freestyle 293-F au fost transfectate cu MG3755C453, MG5816C626 și MV1622, având ca rezultat IgG PB10651p10. După purificare, s-a determinat producția de PB10651 (MV1622) la 29 mg per litru de volum de producție prin măsurarea OD280. S-a efectuat analiza CEX-HPLC pe proteina purificată (Figura 33), indicând un vârf principal cu variante de sarcină acidă la un timp de retenție de 15 minute reprezentând molecula bispecifică PB10651(MV1622). Un vârf mic (< 5%) reprezentând homodimeri MF3755xMF3755 DEDE este vizibil la cca 11 minute.

În plus, s-a efectuat un test reporter ADCC. Datele arată că PB10651afucozilat (MV1622) prezintă activitate ADCC crescută semnificativ pentru toate liniile celulare în combinație cu varianta de receptor Fc γ RIIIa mare (V158) și mic (F158). PB10651 non-afucozilat, de control, a prezentat o oarecare activitate ADCC în celule A431 combinate cu celule efectoare ale variantei de receptor Fc γ RIIIa cu afinitate mare, dar semnalul a fost semnificativ mai mic decât semnalul PB10651(MV1622). Pentru celelalte combinații de linii celulare/celule efectoare, PB10651 a fost negativ, în timp ce PB10651(MV1622) a prezentat

activitate ADCC puternică. PG1337 (anti-toxoid tetanic) este un IgG de control, fără legare, care a fost negativ în toate experimentele (Figura 34).

Exemplul 7 Eficiența *in vivo* a anticorpului

Selectarea modelului animal

Eficiența terapeutică a PB10651(MV1622) afucozilat a fost evaluată în șoareci imunocompromiși purtători de tumori de la pacienți colorectali - cunoscute ca modele de xenogrefe provenite de la pacienți (PDX). Modelele PDX CR2519, CR2161, CR2501, CR0150 și CR0193 (baza de date Crown Bioscience, (<http://hubase2.crownbio.com>) au fost selectate pe baza expresiei genelor LGR5 și EGFR, analizate prin secvențiere ARN (RNAseq). Modelele au prezentat diferite stări ale genei KRAS, și anume CR2519 și CR2161 au fost de tip sălbatic pentru KRAS, iar CR2501, CR0150 au fost KRAS G12V și CR0193 au fost KRAS au fost mutanți G13D. CR0231 și CR2501 au fost sensibile la Cetuximab, iar CR0150 a prezentat răspuns scăzut la Cetuximab.

Analiza expresiei genice

Pentru a verifica dacă modelele PDX au reținut nivelurile de expresie mRNA LGR5 și EGFR indicate în animalele folosite în studiul de eficiență, expresia în tumorile vii s-a comparat cu cea din tumorile PDX. ARN s-a extras din rezerva tumorală (material congelat) și tumori vii (animale din studiu), s-a omogenizat cu TRIzol (Ambiom 15596-018) și Tissue Lyser II (Qiagen 85300). ARN a fost apoi purificat cu RNeasy Mini Kit (Qiagen 74106) și RNase-Free DNase Set (Qiagen 76254). Calitatea ARN a fost confirmată prin spectrofotometru NanoDrop™. cADN s-a preparat prin transcriere inversă (ABI 4374966). Expresia LGR5 și EGFR s-a măsurat prin reacție RT-PCR în timp real folosind sonde TaqMan Hs00969422_m1 și Hs01076090_m1 și s-a normalizat la expresia gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) folosind sonda TaqMan Hs02758991_g1. Datele au fost analizate prin calculul diferenței valorii Ct între gena de interes și GAPDH și conversia acesteia la puterea 2. Figura 35 arată că toate cele șase modele PDX folosite în studiul de eficiență au prezentat o expresie a EGFR și LGR5 comparabilă cu cea a tumorilor PDX congelate inițiale. Expresia LGR5 în aceste șase modele a fost de peste o mie de ori mai mare decât în modelul PDX prezentând cea mai mică expresie LGR5 (CR01560) din colecția disponibilă de 137 de modele PDX de cancer

colorectal. Expresia mRNA EGFR în cele șase modele selectate a fost mai mică decât CR1197, care a prezentat cea mai mare expresie EGFR din întreaga colecție CRC PDX.

Studiul eficienței în PDX

Șoarecii BALB/c fără păr au fost inoculați subcutanat în partea dreaptă cu un fragment tumoral PDX (diametru de 2-3 mm) provenit din unul din cele cinci modele tumorale PDX de cancer colorectal (CR2519, CR2161, CR2501, CR0150 și CR0193).

Tumorile au fost lăsate să crească la un volum de 100-200mm³. Șoarecii au fost tratați apoi cu patru doze intraperitoneale (i.p.) săptămânale de PBS (200 μl) sau PB10651 afucozilat (0.5 mg per animal în PBS). Tumorile s-au măsurat de două ori pe săptămână cu un șubler și volumul tumoral (TV) s-a calculat folosind formula $TV = 0.5 \times a \times b^2$, unde a și b au fost diametrele lungi și scurte ale tumorii. PB10651 afucozilat a prezentat activitate tumoristatică puternică în modele PDX CR2519 și CR0193 și această activitate a fost similară cu Cetuximab (Figura 36). PB10651 afucozilat a prezentat activitate anti-tumorală limitată, dar semnificativă în model PDX CR2501, în timp ce Cetuximab nu a reușit să reducă semnificativ creșterea tumorală. Modelele PDX CR2161 și CR0150 nu au răspuns puternic la Cetuximab sau PB10651 afucozilat și au prezentat doar o tendință de activitate anti-tumorală pentru PB10651 afucozilat (Figura 36).

Exemplul 8 Studii de xenogrefă P18T și C31M

Materiale și metode

Imunohistochimie tumoroidelor P18

După 48 de ore de la adăugarea anticorpilor, mediul de cultură s-a îndepărtat și s-au fixat picături de BME pe o placă cu 48 de godeuri în 300μL de formalină 2 ore la temperatura camerei. Picăturile BME s-au spart apoi manual cu ajutorul unei pipete, s-au peletizat și s-au introdus în formalină proaspătă fără a distruge peletul. Peletele s-au lăsat la temperatura camerei peste noapte înaintea spălării în PBS de trei ori. Peletul a fost resuspendat cu grijă în PBS și introdus într-o microcasetă pentru procesare de către IRB (Institute for Research in Biomedicine) pentru generarea secțiunilor încorporate în parafină.

Colorarea cu Ki67 și caspaza-3 clivată s-a realizat de către IRB folosind Autostainer Plus (Dako - Agilent). Înaintea colorării, secțiunile au fost deparafinizate ca parte din procesul

de recuperare a antigenului folosind soluții de recuperare EnVision™ FLEX cu pH mic (Dako, Burlington) 20 min la 97°C folosind PT Link (Dako - Agilent). Peroxidaza endogenă a fost stinsă 10 min folosind soluție de blocare a peroxidazei (Dako REAL S2023). Anti-Ki67 policlonal de iepure (ab15580, Abcam) și anti-caspaza 3 policlonal de iepure (Cell signaling, 9661S) s-au diluat la 1:1000 și 1:500 și s-au incubat 60 și 120 min la temperatura camerei. S-a folosit IgG BrightVision poli-HRP-anti iepure fără biotină pentru anticorpul secundar (Immunologic, DPVR-110HRP) și s-a incubat 30 min la temperatura camerei. Colorarea a fost indicată folosind 3-3'-diaminobenzidina (K3468, Dako) 5 min. Secțiunile au fost contracolorate cu hematoxină (Dako, S202084) și montate cu mediu de montare fără toluen (CS705, Dako) folosind Dako CoverStainer. Specificitatea colorării a fost confirmată prin omiterea anticorpului primar. Imaginile au fost captate folosind Nikon Eclipse E600 atașat de o cameră Nikon DS-Ri1.

Tratarea xenogrefelor de organoid P18T și C31M

Toate experimentele pe șoareci au fost aprobate de Comitetul de îngrijire și utilizare a animalelor, Barcelona Science Park (CEEA-PCB), și de guvernul catalan sub numărul de protocol DAAM7329. Tumoroidale au fost crescute șapte zile înaintea descompunerii într-o suspensie de celule individuale pentru injecție. Condițiile de cultură și metoda de creare a celulelor individuale sunt descrise în secțiunea "Colorarea FACS a celulelor obținute din organoid P18T folosind 5 anticorpi cLC anti-LGR5 selectați". Pentru toate studiile cu șoareci s-au folosit femele NOD.CB17/AlhnrJ-Prkdcscid/Rj (Janvier Labs) cu vârsta între 6-8 săptămâni. Xenogrefele au fost inițiate prin injectarea subcutanată a 100 μ L de soluție BME:PBS (50:50) conținând 200.000 celule P18T sau 1.000.000 celule C31M. Când volumul tumoral a atins 300 mm³, șoarecii au fost sacrificați și tumorile recoltate. O tumoare a fost tăiată manual în bucăți mici de aproximativ 0.5 mm x 0.5 mm x 0.5 mm (lățime x lungime x înălțime). Acestea s-au introdus apoi în patru părți ale șoarecilor NOD-SCID primitivi, folosind o bucată/parte. S-a folosit un trocar pentru implant, un dispozitiv care împinge tumoarea sub piele. Pentru grefare s-au folosit în total 30 de șoareci. Când volumul tumoral a atins o medie de 50 mm³, șoarecii au fost alocați aleatoriu într-un grup de tratament. Șoarecii au fost injectați o dată pe săptămână, timp de patru săptămâni, cu 200 μ L de PBS (pH 7.4 Gibco Ref 10010-015), Cetuximab (lot clinic, 5mg/ml) sau PB10651 afucozilat (2,5 mg/ml). Cetuximab și PB10651 afucozilat s-au injectat la o doză de 0.5 mg/șoarece, indiferent de greutatea șoarecelui. Volumul tumoral a fost calculat folosind șublere manuale cu măsurători efectuate

de trei ori pe săptămână și folosind formula: (lungime x lățime x înălțime)/2. Șoarecii au fost sacrificați când volumul tumoral a depășit 300 mm³, tumoarea a ulcerat sau s-a atins punctul final al studiului; la 28 de zile de la prima injecție cu anticorp. Dacă numai o singură tumoare pe un șoarece a necesitat prelevare din cauza dimensiunii/ulcerației, acesta s-a rezecat, lăsându-le pe celelalte pentru studiu ulterior. Dacă au fost necesare rezecții suplimentare sau colectarea tumorilor multiple, șoarecele a fost sacrificat și toate probele s-au prelevat simultan. Datele sunt exprimate în raport cu ziua 0 (prima zi a tratamentului) și s-a efectuat un t-test cu probe împerecheate între fiecare grup de tratament folosind GraphPad Prism.

Rezultate

Colorarea Ki67 este un indicator al proliferării celulare și s-a folosit pentru a determina dacă efectele asupra creșterii cauzate de tratamentele cu anticorp s-au datorat unei reduceri a proliferării. Tumoroidale au fost tratate *in vitro* 48 de ore (2 μg/mL) înainte de fixare. Tratarea tumoroidelor cu PB10651 afucozilat a determinat o scădere a numărului de celule pozitive și a intensității colorării, comparativ cu celelalte grupuri de tratament (Figura 37). Cetuximab și anticorpul EGFR-TT au determinat o scădere modestă a numărului de celule pozitive față de tratamentul de control TT-TT. S-a efectuat și colorarea cu caspaza-3 clivată pentru a evalua dacă anticorpul a favorizat apoptoza. S-au observat niveluri mici de apoptoză în grupurile de control TT, tratament EGFR-TT și cetuximab, cu colorare comparabilă observată între cele trei grupuri. Numărul celulelor pozitive a crescut în grupul tratat cu PB10651 afucozilat. Aceste rezultate sugerează că anticorpul bispecific PB10651 afucozilat este superior în reducerea proliferării și inducerea apoptozei față de cetuximab și brațul anti-EGFR individual.

Xenogrefele s-au realizat în șoareci NOD-SICD și s-au tratat o dată pe săptămână timp de patru săptămâni cu PB10651 afucozilat (0.5 mg/șoarece/săptămână), Cetuximab (0.5 mg/șoarece/săptămână) sau PBS. Pentru evaluarea răspunsurilor la anticorpi, volumele tumorale au fost monitorizate și comparate între grupuri. Tratamentul cu PB10651 afucozilat a determinat o reducere semnificativă a creșterii medii a volumului tumoral în comparație cu PBS și cetuximab pentru modelele de xenogrefă P18T și C31M începând cu ziua 2 ($P < 0.01$ pentru toate intervalele, Figura 38). În modelul de xenogrefă P18T, șoarecii tratați cu Cetuximab au prezentat cinetică de creștere similară la șoarecii tratați cu PBS și, din cauza volumelor tumorale mari, cei mai mulți dintre șoarecii din grupul PBS și cetuximab au necesitat îndepărtare din studiu în ziua 16. În ziua 20 modificarea medie a volumului tumoral a fost 15.2 (±5.3) și 14.2 (±9.9) pentru PBS, respectiv cetuximab, în timp ce pentru grupul

PB10651 afucozilat, valoarea a fost 4.5 (± 0.59). Timpii de dublare a tumorii, determinați prin ajustarea curbei neliniare a unei ecuații de creștere exponențială, s-au calculat ca fiind 9 zile pentru grupurile PBS și cetuximab și 6 zile pentru grupul de tratament cu PB10651 afucozilat, o scădere de 30% a timpului de dublare a tumorii. În mod similar, în modelul de xenogrefă C31M, PB1065 a redus semnificativ creșterea tumorală comparativ cu grupurile PBS și cetuximab (Figura 38).

Exemplul 8: Studiul de toxicitate non-GLP la macac folosind doze repetate de PB10651.

Pentru evaluarea toxicității posibile a PB10651, s-a efectuat un studiu de toxicitate cu doze repetate non-GLP pe maimuțe macac. Pentru brațul Fab EGFR prezent în PB10651, se poate aștepta toxicitate în piele și tractul gastro-intestinal (GI). În cazul anticorpului anti-EGFR Cetuximab (Erbix), s-au observat decese la maimuțe la o doză săptămânală de 75 mg/kg din cauza toxicității severe la nivelul pielii, o doză de 24 mg/kg/săptămână fiind cea mai mare doză tolerată în studiile de toxicitate cronică la maimuțe. În cazul Panitumumab (Vectibix), s-a observat mortalitate la maimuțe la o doză de 30 mg/kg/săptămână după numai trei săptămâni de tratament într-un studiu de 4 săptămâni, cu decese ocazionale la doze mai mici (7.5 și 15 mg/kg/săptămână) într-un studiu de toxicitate IV de 13 săptămâni. Pe baza acestor informații, s-a selectat un nivel al dozei de 25 mg/kg pentru PB10651 ca cea mai mare doză în acest studiu. S-au folosit un mascul și o femelă per grup și s-au prevăzut patru grupuri: control (doar vehicul), 2.5 mg/kg/săptămână, 7.5 mg/kg/săptămână și 25 mg/kg/săptămână și s-au administrat patru doze săptămânale în fiecare grup. Anticorpul s-a administrat la animale prin perfuzie intravenoasă o oră.

Rezultate

Studiile de toxicitate la maimuțe macac cu Cetuximab și Panitumumab au indicat toxicitate dermică (eritem, uscăciune/exfoliere/pierderea părului) și efecte în tractul gastro-intestinal (GI) (scaun moale/diaree, deshidratare) ca toxicități de limitare a dozei (EMA-EPAR 2004 cetuximab, EMA-EPAR 2007 panitumumab), în conformitate cu activitatea anti-EGFR a compușilor testați. Însă, pentru PB10651, chiar și la cea mai mare doză administrată în acest studiu, nu s-a observat toxicitate de piele sau de tract GI după administrare repetată. S-au observat semne clinice, cum ar fi subțierea blănii, vânătăi și incidența de scaun moale, în mod egal în grupurile active și de control și aceste semne clinice nu au fost considerate așadar asociate cu medicamentul. Nu au existat modificări ale greutateii organelor și/sau ale raporturile

de greutate ale organelor considerate asociate cu administrarea PB10651. În plus, nu au existat observații macroscopice sau microscopice considerate asociate cu administrarea PB10651. În concluzie, administrarea intravenoasă (perfuzie) o dată pe săptămână a PB10651 la maimuțe macac timp de 4 săptămâni nu a dus la modificări ale greutății organelor sau ale raporturile de greutate ale organelor, observații macroscopice sau microscopice considerate asociate cu administrarea PB10651.

Activitatea care a condus la prezenta invenție a primit finanțare de [Uniunea Europeană] [Comunitatea Europeană a Energiei Atomice] Al șaptelea program-cadru ([FP7/2007-2013] [FP7/2007-2011]) sub n° 14

Tabel 1: Titre ale șoarecilor MeMo® imunizați cu succes.

Șoarece #	Antigen imunizat	Titru seric FACS	Bibliotecă	Dimensiune bibliotecă
L1	pVax1 <i>hLGR4-2xFLAG-2xHA</i>	hLGR4 100	ML1246	2.8×10^7
	pVax1 <i>hLGR5-2xFLAG-2xHA</i>	hLGR5 0		
H1	rhLGR5-Fc	hLGR5<100	ML1247	2.5×10^7
H2	rhLGR5-Fc	hLGR5<100	ML1248	2.2×10^7
H3	rhLGR5-Fc	hLGR5 100	ML1249	2.6×10^6
H4	rhLGR5-Fc	hLGR5 100	ML1250	7.7×10^6
H5	rhLGR5-Fc	hLGR5 100		
H6	rhLGR5-Fc	hLGR5 100	ML1251	1.6×10^7
L19	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1223	1.0×10^7
L20	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1224	7.8×10^6
L21	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1225	1.2×10^7
L22	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1226	8.1×10^6
L23	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1227	6.1×10^6
L24	rhZNRF3-Fc	hZNRF3 100	ML1228	5.0×10^6
K14	rhRNF43-Fc	hRNF43 100	ML1229	9.1×10^6
K15	rhRNF43-Fc	hRNF43 100	ML1230	2.0×10^6
K17	rhRNF43-Fc	hRNF43 100	ML1231	5.4×10^6

Tabel 2: Prezentarea grupurilor de anticorp generate din repertorii de anticorpi fagici față de diferite ținte WNT.

Țintă **Dimensiunea finală a grupului de anticorpi
(numărul clonelor diferite caracterizate)**

LGR4	66
LGR5	84
ZNRF3	105
RNF43	33

Tabel 3: Caracteristicile IgG bispecfici conținând un grup selectat de fragmente Fab de țintire Wnt împotriva LGR4, LGR5, ZNRF3 și RNF43 combinate cu fragmentul Fab de toxoid tetanic.

PB#	Fragmen t Fab țintă	Titrar e FACS	Blocare R- spondin		Stabilitate 140C			
		AUC	% legar e	Blocar e	OD ₄₅₀ 4° C	OD ₄₅₀ 40° C	% (OD ₄₅₀ 40°C / OD ₄₅₀ 4°C)	Stabil la 40°C
PB1025 1	LGR4	28154	102	Nu	0.452	0.248	55	Da
PB1025 2	LGR4	12888	103	Nu	0.099	0.064	65	NA
PB1026 1	LGR5	43103	59	Parțial	1.005	0.876	87	Da
PB1027 3	LGR5	27178	92	Nu	1.793	1.819	101	Da
PB1027 5	LGR5	24879	94	Nu	1.677	1.664	99	Da
PB1027 8	LGR5	22197	80	Parțial	0.655	0.401	61	Da
PB1027 9	LGR5	24974	82	Nu	0.839	0.597	71	Da
PB1028 4	LGR5	40187	59	Parțial	0.985	0.867	88	Da
PB1028 6	LGR5	41872	95	Nu	1.050	0.964	92	Da
PB1028 7	LGR5	19378	107	Nu	0.810	0.609	75	Da
PB1029 0	LGR5	44272	67	Parțial	1.059	1.043	98	Da

PB#	Fragmen t Fab țintă	Titrar e FACS	Blocare R- spondin		Stabilitate 140C			
		AUC	% legar e	Blocar e	OD ₄₅₀ 4° C	OD ₄₅₀ 40° C	% (OD ₄₅₀ 40°C / OD ₄₅₀ 4°C)	Stabil la 40°C
PB10300	ZNRF3	32012	90	Nu	1.693	1.264	75	Parțial
PB10302	ZNRF3	29235	102	Nu	1.783	1.722	97	Da
PB10304	ZNRF3	38321	75	Parțial	1.747	1.336	76	Parțial
PB10309	ZNRF3	19446	93	Nu	1.688	1.087	64	Da
PB10328	ZNRF3	26933	86	Nu	1.714	1.776	104	Da
PB10330	ZNRF3	46341	50	Da	1.793	1.357	76	Da
PB10332	ZNRF3	24318	93	Nu	1.602	1.415	88	Da
PB10333	ZNRF3	36923	82	Nu	1.434	1.137	79	Da
PB10346	RNF43	82605	29	Da	1.397	1.377	99	Da
PB10349	RNF43	92972	71	Parțial	1.523	1.529	100	Da
PB10350	RNF43	93258	33	Da	1.430	1.325	93	Da

Se indică titrarea de afinitate FACS, ELISA de blocare R-Spondin3 și ELISA de stabilitate la 40°C. Pentru titrarea afinității FACS, se indică valorile zonei de sub curbă (AUC). Pentru ELISA de blocare R-Spondin, s-a indicat legarea procentuală rămasă per IgG compativ cu valoarea de legare maximă (setată la legare 100%), precum și concluzia finală din 2 experimente independente. Se indică ELISA de stabilitate la 40°C. Se indică valorile OD_{450nm} după o săptămână la 4°C și la 40°C în tabel. Sunt indicate în tabel raporturile (procentuale) ale OD_{450nm} pentru 4°C versus 40°C. Concluzia finală este introdusă în coloana din dreapta, dacă un IgG este considerat stabile, parțial stabil sau NA când semnalele OD au fost sub 0.1.

Tabel 4: Punctajele factorului Z' pentru diferite caracteristici și un punctaj de parametri multipli în diferite organoide, comparând creșterea cu și fără EGF în tumoroide dependente de EGF.

Punctajul factorului Z' cu parametri multipli a fost similar sau mai mare decât punctajele caracteristicilor individuale, demonstrând că utilizarea unui astfel de punctaj este sensibil și se poate aplica în organoide diferite multiple care suferă diferite răspunsuri fenotipice după tratament cu factor de creștere.

Z' - factor	P18T	P14T	P8T
Număr nucleii	0.58	-0.34	-0.68
Dimensiune tumoroid	-0.01	0.18	0.05
Număr lumene	-0.56	0.56	0.27
Rotunjire lumene	0.22	0.13	0.30
Parametri multipli	0.80	0.53	0.50

Tabel 5: Combinații preferate de lanțuri grele pentru anticorpi bispecfici care leagă LGR4/EGFR; LGR4/HER3; LGR5/EGFR; LGR5/HER3; RNF43/EGFR; RNF43/HER3; și ZNRF3/EGFR; ZNRF3/HER3. TT este un lanț greu pentru toxoid tetanic, de referință

		TT	EGFR			
		MF1337	MF3755	MF4280	MF3370	MF4289
TT	MF1337	PB4248	PB9919	PB9647	PB9920	PB10104
LGR4	MF5777	PB10251	PB10619	PB10620	PB10621	PB10622
	MF5781	PB10252	PB10623	PB10624	PB10625	PB10626
LGR5	MF5790	PB10261	PB10627	PB10628	PB10629	PB10630
	MF5803	PB10273	PB10631	PB10632	PB10633	PB10634
	MF5805	PB10275	PB10635	PB10636	PB10637	PB10638
	MF5808	PB10278	PB10639	PB10640	PB10641	PB10642
	MF5809	PB10279	PB10643	PB10644	PB10645	PB10646
	MF5814	PB10284	PB10647	PB10648	PB10649	PB10650
	MF5816	PB10286	PB10651	PB10652	PB10653	PB10654
	MF5817	PB10287	PB10655	PB10656	PB10657	PB10658
	MF5818	PB10290	PB10659	PB10660	PB10663	PB10664
RNF43	MF5832	PB10346	PB10661	PB10662	PB10665	PB10666
	MF5836	PB10349	PB10667	PB10668	PB10669	PB10670
	MF5839	PB10350	PB10671	PB10672	PB10673	PB10674
ZNRF3	MF5850	PB10300	PB10675	PB10676	PB10677	PB10678
	MF5853	PB10302	PB10679	PB10680	PB10681	PB10682
	MF5855	PB10304	PB10683	PB10684	PB10685	PB10686
	MF5862	PB10309	PB10687	PB10688	PB10689	PB10690
	MF5882	PB10328	PB10691	PB10692	PB10693	PB10694
	MF5884	PB10330	PB10695	PB10696	PB10697	PB10698
	MF5887	PB10332	PB10699	PB10700	PB10701	PB10702
	MF5888	PB10333	PB10703	PB10704	PB10705	PB10706

Tabel 5 continuare

		TT	HER3			
		MF1337	MF3178	MF3176	MF3125	MF4863
TT	MF1337	PB4248	PB9215	PB9921	PB9918	PB10111
LGR4	MF5777	PB10251	PB10707	PB10708	PB10709	PB10710
	MF5781	PB10252	PB10711	PB10712	PB10713	PB10714
LGR5	MF5790	PB10261	PB10715	PB10716	PB10717	PB10718
	MF5803	PB10273	PB10719	PB10720	PB10721	PB10722
	MF5805	PB10275	PB10723	PB10724	PB10725	PB10726
	MF5808	PB10278	PB10727	PB10728	PB10729	PB10730
	MF5809	PB10279	PB10731	PB10732	PB10733	PB10734
	MF5814	PB10284	PB10735	PB10736	PB10737	PB10738
	MF5816	PB10286	PB10748	PB10749	PB10750	PB10751
	MF5817	PB10287	PB10752	PB10753	PB10754	PB10755
	MF5818	PB10290	PB10756	PB10757	Not made	Not made
RNF43	MF5832	PB10346	Not made	Not made	PB10758	PB10759
	MF5836	PB10349	PB10764	PB10765	PB10766	PB10767
	MF5839	PB10350	PB10768	PB10769	PB10770	PB10771
ZNR3	MF5850	PB10300	PB10772	PB10773	PB10774	PB10775
	MF5853	PB10302	PB10776	PB10777	PB10778	PB10779
	MF5855	PB10304	PB10780	PB10781	PB10782	PB10783
	MF5862	PB10309	PB10784	PB10785	PB10786	PB10787
	MF5882	PB10328	PB10788	PB10789	PB10790	PB10791
	MF5884	PB10330	PB10792	PB10793	PB10794	PB10795
	MF5887	PB10332	PB10796	PB10797	PB10798	PB10799
	MF5888	PB10333	PB10800	PB10801	PB10802	PB10803

Tabel 6: Combinații preferate de lanțuri grele pentru anticorpi bispecfici care leagă LGR4/EGFR; LGR4/HER3; LGR5/EGFR; LGR5/HER3; RNF43/EGFR; RNF43/HER3; și ZNR3/EGFR; ZNR3/HER3. TT este un lanț greu pentru toxoid tetanic, de referință.

		TT	EGFR	HER3
		MF1337	MF3755	MF3178
TT	MF1337	PB4248	PB9919	PB9215
LGR4	MF5777	PB10251	PB10619	PB10707
	MF5781	PB10252	PB10623	PB10711
LGR5	MF5790	PB10261	PB10627	PB10715
	MF5803	PB10273	PB10631	PB10719
	MF5814	PB10284	PB10647	PB10735
	MF5816	PB10286	PB10651	PB10748
	MF5817	PB10287	PB10655	PB10752

		TT	EGFR	HER3
		MF1337	MF3755	MF3178
	MF5818	PB10290	PB10659	PB10756
RNF43	MF5832	PB10346	PB10661	PB12336
	MF5836	PB10349	PB10667	PB10764
ZNRF3	MF5850	PB10300	PB10675	PB10772
	MF5853	PB10302	PB10679	PB10776
	MF5855	PB10304	Neefectuat	PB10780
	MF5884	PB10330	PB10695	Neefectuat
	MF5888	PB10333	PB10703	PB10800

Tabel 7: Lista anticorpilor comparativi copiați din literatură cu numărul intern. Secvențele

VH și VL ale anticorpilor au fost copiate din brevete, preparate ca cADN-uri sintetice și clonate într-un vector de expresie pentru expresia IgG1 uman. Anticorpilor au fost exprimați și purificați prin proceduri standardizate.

Anticorp	Țintă	Companie	Specie	Număr intern
hu8E11v2	LGR5	Genentech	Umanizat	PG7543
BNC101	LGR5	Bionomics	Umanizat	PG7709
OMP18R5	FZD7	OncoMed	Uman	PG7710
OMP88R20	LGR5	OncoMed	Uman	PG7711
OMP88R21	LGR5	OncoMed	Uman	PG7712
OMP131RO	RSPO3	OncoMed	Umanizat	PG7713

Tabel 8: Reziduuri în EGFR și LGR5 relevante pentru legarea PB10651 de țintă în analiza de mutagenză shotgun.

Reziduuri LGR5	relevante	Reziduuri EGFR	relevante
D43A		I462A	
G44A		G465A	
M46A		K489A	
F67A		I491A	
G90A		N493A	
F91A		C499A	

Tabel 9 Nivelurile de expresie mRNA EGFR și LGR5 în tumori PDX folosite pentru colorarea FACS *ex vivo* .

Denumire celulă	Tip de cancer	EGFR log2(FPKM)	LGR5 log2(FPKM)
EX-CR2394	Cancer colorectal	Neefectuat încă	Neefectuat încă
EX-OV3077	Cancer ovarian	2.178	6.1989
EX-GA6239	Cancer gastric	2.4679	5.3676
EX-HN2195	Cancer la cap și gât	8.9258	5.3171
EX-LI0574	Cancer hepatic	3.6252	5.0135
EX-GA6210	Cancer gastric	1.0841	4.6505
EX-OV1286	Cancer ovarian	2.3905	4.6434
EX-CC6638	Colangiocarcinom	3.3147	3.5631
EX-LU2529	Cancer pulmonar	4.0328	3.2662
EX-OV0273	Cancer ovarian	-2	3.0802
EX-LU6429	Cancer pulmonar	4.0896	2.897
EX-ES0201	Cancer esofagian	5.6923	1.8035

Tabel 10: Valorile de intensitate medie a fluorescenței (MFI) obținute după colorarea *ex vivo* a xenogrefelor provenite de la pacienți cu diferite boli.

Tip de cancer	Model Crown	Valoarea intensității medii a fluorescenței (MFI)		
		PG5816 (anti-LGR5)	PG3755 (anti-EGFR)	PG1337 (anti-TT control)
Cancer ovarian	OV1286	7482	2120	1575
Cancer ovarian	OV0273	5960	2152	1728
Cancer esofagian	ES0201	5772	5967	1642
Cancer colorectal	CR2394	3661	2602	1879
Cancer gastric	GA6210	3240	1003	1105
Cancer hepatic	LI0574	2543	6110	1070
Cancer gastric	GA6239	2265	2104	1731
Cancer la cap și gât	HN2195	1846	11814	1134
Cancer pulmonar	LU2529	1705	6863	1685
Cancer pulmonar	LU6429	1532	6081	1006
Colangiocarcinom	CC6638	1370	9366	1104