

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292743** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.25

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.29

**(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ТОЛЬКО ТЯЖЕЛЫЕ ЦЕПИ,  
С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КОНСТАНТНЫМИ ОБЛАСТЯМИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ**

(31) 63/017,589; 63/108,796

(32) 2020.04.29; 2020.11.02

(33) US

(86) PCT/US2021/029909

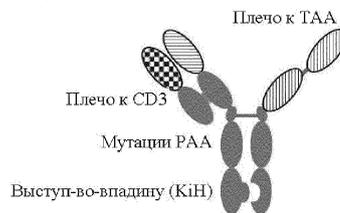
(87) WO 2021/222578 2021.11.04

(71) Заявитель:  
ТЕНЕОБИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Харрис Кэтрин, Шелленбергер Уте,  
Вафа Омид, Тринклайн Натан, Ван  
Схотен Вим, Форс Альдред Шелли,  
Фем Дуй, Кларк Старлин (US)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Предложены человеческие полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи (например, UniAb™), которые имеют модифицированные константные области тяжелой цепи, которые придают полезные свойства. Данное изобретение также относится к способам получения таких антител, композиций, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применения для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией одной или более мишеней связывания, описанных в данном документе.



202292743

A1

A1

202292743

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ТОЛЬКО  
ТЯЖЕЛЫЕ ЦЕПИ, С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КОНСТАНТНЫМИ  
ОБЛАСТЯМИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет даты подачи по предварительной заявке на патент США № 63/017589, поданной 29 апреля 2020 г., а также предварительной заявке на патент США № 63/108796, поданной 2 ноября 2020 г., описания каждой из заявок полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к человеческим полиспецифическим антителам, содержащим только тяжелые цепи, (например, UniAb™), которые имеют модифицированные константные области тяжелой цепи, придающие полезные свойства. Данное изобретение также относится к способам получения таких антител, композиций, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применения для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией одной или более мишеней связывания, описанных в данном документе.

Уровень техники

Модифицированные области Fc

Достижения в области белковой инженерии привели к успешному производству и клиническому применению полиспецифических антител, имеющих аффинность связывания с двумя или более мишенями. Однако из-за их гетеродимерной природы необходимо использовать соответствующие меры для облегчения надлежащего спаривания желаемой комбинации связывающих последовательностей и, следовательно, полипептидных субъединиц в полиспецифическом антителе. Wang et al., mAbs 10:8, 1226-1235 (2018).

Один из подходов, позволяющих обойти проблему неправильно спаренных полипептидных субъединиц, известен как «выступы-во-впадины» (KiH), и он направлен на форсирование спаривания двух разных тяжелых цепей антител путем введения мутаций в домены CH2 и/или CH3 для модификации поверхности взаимодействия. В одной цепи аминокислоты с объемной боковой цепью заменяются аминокислотами с короткими боковыми цепями, образуя «впадину». И наоборот, аминокислоты с большими боковыми цепями встраивают в другую тяжелую цепь для создания «выступ». При совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей наблюдается более высокий выход образования гетеродимера («выступ-впадина») по сравнению с образованием гомодимера

(«впадина-впадина» или «выступ-выступ») из-за более благоприятной стабильности пары «выступ-впадина» (Ridgway, J.B., et al, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; и WO 96/027011).

Хотя эта стратегия кажется привлекательной для получения желаемого гетеродимера, другие свойства получаемых полиспецифических антител в значительной степени зависят от конкретной аминокислотной последовательности области Fc, а именно, эффекторные функции, такие как, например, комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Кроме того, активность эффекторной функции может индуцировать выработку цитокинов, что может привести к «цитокиновому шторму», нежелательных воспалительных ответов. Gupta et al., *Journal of Interferon & Cytokine Research* 40:1, 19-23 (2019). Соответственно, в определенных условиях существует необходимость уменьшить или полностью устранить эффекторные функции, например, чтобы избежать повреждения или гибели иммунной клетки (например, Т-клетки), с которой связывается полиспецифическое антитело, и/или чтобы избежать нежелательной выработки цитокинов и возникающих нежелательных воспалительных ответов.

Кроме того, введение аминокислотных модификаций в белок может иметь серьезные недостатки, а именно индуцировать у пациента иммунный ответ против белка на основе присутствия ненативных последовательностей. Таким образом, разработка полиспецифических антител требует выявления последовательностей, которые по общей структуре очень похожи на структуру встречающихся в природе антител (таких как IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с минимальным отклонением от нативных последовательностей, но которые обеспечивают возможность успешного включения модификаций, позволяющих одновременно достичь целей облегчения желаемой гетеродимеризации, а также снижения или устранения одной или более эффекторных функций.

Чтобы сбалансировать эти конкурирующие требования, изобретатели сосредоточились на Fc IgG4, нативная последовательность которого, как известно, имеет относительно низкий уровень активности эффекторной функции. Crescioli et al., *Curr Allergy Asthma Rep* 16:7 (2016). Однако, несмотря на это кажущееся преимущество, известно, что IgG4 подвергается реакции обмена цепей *in vivo* из-за его особой последовательности шарнирной области, что создает дополнительные трудности для достижения желаемой гетеродимеризации. Labrijn et al., *Nature Biotechnology* 27, 767-71 (2009). Таким образом, существует потребность в модифицированных последовательностях константной области тяжелой цепи, которые обеспечивают желаемую гетеродимеризацию, включают модификации, которые снижают или устраняют эффекторные функции, и в то же время включают модификации, которые уменьшают или

устраняют реакции обмена цепями в IgG4. Описанные в данном документе молекулы решают эти и другие проблемы.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи

В обычном антителе IgG, ассоциация тяжелой цепи и легкой цепи частично обусловлена гидрофобным взаимодействием между константной областью легкой цепи и константным доменом CH1 тяжелой цепи. Существуют дополнительные остатки в каркасной области 2 (FR2) и каркасной области 4 (FR4), которые также вносят вклад в это гидрофобное взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

Известно, однако, что сыворотка верблюдовых (подгруппа Tylopoda, которая включает верблюдов, дромадеров и лам) содержит основной тип антител, состоящих исключительно из парных H-цепей (антитела, содержащие только тяжелую цепь или UniAbs™). UniAb™ Camelidae (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanaco*, *Lama alpacas* и *Lama vicugna*) имеют уникальную структуру, состоящую из одного переменного домена (VHH), шарнирной области и двух константных доменов (CH2 и CH3), которые высокоомологичны доменам CH2 и CH3 классических антител. Данные UniAb™ не имеют первого домена константной области (CH1), который присутствует в геноме, но удаляется во время процессинга мРНК. Отсутствие домена CH1 объясняет отсутствие легкой цепи в UniAbs™, поскольку этот домен является местом присоединения константного домена легкой цепи. Такие UniAbs™ естественным образом эволюционировали для придания антигенсвязывающей специфичности и высокой аффинности тремя CDR из обычных антител, или их фрагментов (Muyldermans, 2001; JBiotechnol 74:277-302; Revets et al., 2005; Expert Opin Biol Ther 5:111-124). Хрящевые рыбы, такие как акулы, также выработали особый тип иммуноглобулина, обозначенный как IgNAR, который лишен легких полипептидных цепей и полностью состоит из тяжелых цепей. Молекулами IgNAR можно манипулировать с помощью молекулярной инженерии с получением переменного домена одного полипептида с тяжелой цепью (vNARs) (Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004); Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)).

Способность антител, содержащих только тяжелые цепи, лишенных легкой цепи, связывать антиген была установлена в 1960-х годах (Jaton et al. (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195). Тяжелая цепь иммуноглобулина, физически отделенная от легкой цепи, сохранила 80% антигенсвязывающей активности относительно тетрамерного антитела. Sitia et al. (1990) Cell, 60, 781-790 продемонстрировали, что удаление домена CH1 из реаранжированного гена  $\mu$  мыши приводит к получению антитела, содержащего только тяжелые цепи, лишенного легкой цепи, в клеточной культуре млекопитающих.

Вырабатываемые антитела сохраняли специфичность связывания VH и эффекторные функции.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, с высокой специфичностью и аффинностью могут образовываться против различных антигенов посредством иммунизации (van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)) и часть VHH может быть легко клонирована и экспрессирована в дрожжевых грибах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)).

Мыши, у которых локус легкой (L) цепи L (лямбда) и/или локусы L-цепи L и k (каппа) были подвергнуты функциональному сайленсингу, и антитела, продуцируемые такими мышами, описаны в патентах США № 7541513 и 8367888. Рекомбинантное продуцирование антител, содержащих только тяжелую цепь, у мышей и крыс было описано, например, в WO2006008548; публикации заявки на патент США № 20100122358; Nguyen et al., 2003, *Immunology*; 109(1), 93-101; Briiggemann et al., *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90; and Zou et al., 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283. Получение нокаутных крыс с помощью микроинъекций эмбрионам цинк-пальцевой нуклеазы описано в Geurts et al., 2009, *Science*, 325(5939):433. Растворимые антитела, содержащие только тяжелые цепи, и трансгенные грызуны, содержащие гетерологичный локус тяжелой цепи, продуцирующий такие антитела, описаны в патентах США № 8883150 и 9365655. Структуры CAR-T, содержащие однодоменные антитела в качестве связывающего (нацеливающего) домена, описаны, например, в Iri-Sofla et al., 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641 and Jamnani et al., 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378- 386.

#### Антиген созревания В-клеток (BCMA)

BCMA, также известный как член суперсемейства фактора некроза опухоли 17 (TNFRSF17) (UniProt Q02223), представляет собой рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый исключительно на плазматических клетках и плазмобластах. BCMA представляет собой рецептор двух лигандов в суперсемействе факторов некроза опухолей (TNF): APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию, также известный как TNFSF13; TALL-2 и TRDL-1; лиганд с высокой аффинностью к BCMA) и фактор активации В-клеток (BAFF) (также известный как BlyS; TALL-1; THANK; zTNF4; TNFSF20 и D8Ertd387e; лиганд с низкой аффинностью к BCMA). APRIL и BAFF являются факторами роста, которые связывают BCMA и способствуют выживанию плазмочитов. BCMA также высоко экспрессируется на злокачественных плазмочитах при множественной миеломе

человека (MM). Антитела, связывающиеся с ВСМА, описаны, например, в Gras et al., 1995, *Int. Immunol.* 7:1093-1106, WO200124811 и WO200124812. Антитела к ВСМА, которые перекрестно реагируют с TACI, описаны в WO 2002/066516. Биспецифические антитела к ВСМА и CD3 описаны, например, в US 2013/0156769 A1 и US 2015/0376287 AL. Сообщалось, что конъюгат антитела к ВСМА с MMAE или с MMAF избирательно индуцирует уничтожение клеток множественной миеломы (Tai et al., *Blood* 2014, 123(20): 3128-38). Ali et al., *Blood* 2016, 128(13): 1688-700 сообщили, что в клиническом исследовании (#NCT02215967) Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR), нацеленными на ВСМА, привели к ремиссии множественной миеломы у пациентов-людей.

### PSMA

PSMA, также известный как простатспецифический мембранный антиген и глутаматкарбоксипептидаза II (UniProt Q04609), представляет собой трансмембранный белок типа II, который обладает активностью N-ацетилированной альфа-связанной кислотой дипептидазы, фолатгидролазы и дипептидилпептидазы. Он кодируется геном FOLH1 у человека и состоит из цитоплазматического домена из 19 аминокислот, трансмембранной части из 24 аминокислот и внеклеточной части из 707 аминокислот. Белок является ферментативно активным в качестве нековалентного гомодимера. PSMA экспрессируется в ткани эпителия предстательной железы и его экспрессия усиливается в злокачественном новообразовании предстательной железы и в новой сосудистой сети солидных опухолей. Он также экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях, таких как мозг, почки и слюнные железы, но его избыточная экспрессия в злокачественной ткани предстательной железы делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения злокачественного новообразования предстательной железы. Он также может быть актуален для терапии или визуализации солидных опухолей, учитывая его высокую экспрессию в злокачественных новообразованных сосудах. Моноклональные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство и Т-клетки с химерным антигенным рецептором, нацеленные на PSMA, были описаны в контексте лечения метастатического злокачественного новообразования предстательной железы (Hernandez-Hoyos et al 2016, PMID: 27406985, DiPippo et al 2014, PMID: 25327986, Serganova et al 2016, PMID: 28345023). Кроме того, радионуклидные конъюгаты, специфичные для PSMA, исследуют в отношении визуализации и лечения рака предстательной железы (например, Hofman et al., 2018 PMID: 29752180).

### CD19

CD19, также известный как поверхностный антиген В-лимфоцитов В4 (UniProt P15391), представляет собой рецептор клеточной поверхности, который экспрессируется на всех человеческих В-клетках, но не обнаружен на плазматических клетках. CD19 представляет собой трансмембранный белок, который рекрутирует цитоплазматические сигнальные белки к мембране и действует в составе комплекса CD19/CD21, снижая порог сигнальных путей В-клеточного рецептора. CD19 имеет относительно большой цитоплазматический хвост из 240 аминокислот. Внеклеточные Ig-подобные домены разделены потенциально дисульфид-связанным не-Ig-подобным доменом и сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазматический хвост содержит по меньшей мере девять остатков тирозина возле С-конца, некоторые из которых, как было показано, фосфорилированы. Наряду с CD20 и CD22 ограниченная экспрессия CD19 в линии В-клеток делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Было описано множество моноклональных антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство, специфичных к CD19 (например, Naddafi et al. 2015, PMC4644525). Кроме того, Т-клетки с химерным антигенным рецептором к CD19 были одобрены для лечения лейкоза (например, Sadelain et al. 2017, PMID: 29245005).

#### Сущность изобретения

Аспекты изобретения относятся к выделенным полиспецифическим антителам, содержащим: первую полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую мутантную константную область IgG4 человека, содержащую мутации S228P, F234A, L235A и T366W; и вторую полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую мутантную константную область IgG4 человека, содержащую мутации S228P, F234A, L235A, T366S, L368A и Y407V. В некоторых вариантах осуществления в мутированной константной области IgG4 человека первой полипептидной субъединицы тяжелой цепи или в мутированной константной области IgG4 человека второй полипептидной субъединицы тяжелой цепи отсутствует домен CH1. В некоторых вариантах осуществления мутантная константная область IgG4 человека первой полипептидной субъединицы тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 73 или 55, а мутированная константная область IgG4 человека второй полипептидной субъединицы тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 72 или 54.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения дополнительно содержат первый связывающий фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении CD3, содержащий: переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую последовательность

SEQ ID NO: 37, и последовательность CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38; и переменный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39, последовательность CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и последовательность CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в переменном домене тяжелой цепи первого связывающего фрагмента присутствуют в каркасной области VH человека; и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в переменном домене легкой цепи первого связывающего фрагмента присутствуют в каркасной области V-каппа человека. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 42; и переменный домен легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 42; и переменный домен легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения дополнительно содержат второй связывающий фрагмент, имеющий специфичность связывания с белком, отличным от CD3. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий фрагмент содержит одну переменную область тяжелой цепи в одновалентной или двухвалентной конфигурации. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий фрагмент содержит полипептидную субъединицу легкой цепи и полипептидную субъединицу тяжелой цепи, а второй связывающий фрагмент содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления полипептидная субъединица легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления белок, отличный от CD3, представляет собой опухлеассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифический антиген (TSA). В некоторых вариантах осуществления ТАА представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA). В некоторых вариантах осуществления ТАА представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления ТАА представляет собой простат-специфический мембранный антиген (PSMA).

Аспекты изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие полиспецифическое антитело, как описано в данном документе, полинуклеотиды, кодирующие полиспецифическое антитело, как описано в данном документе, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки, содержащие такие векторы.

Аспекты изобретения включают способы получения полиспецифического антитела, как описано в данном документе, включающие выращивание клетки, в условиях, подходящих для экспрессии полиспецифического антитела, и выделение полиспецифического антитела из клетки.

Аспекты изобретения включают способы лечения, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективной дозы полиспецифического антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

Аспекты изобретения включают применение полиспецифического антитела, описанного в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида.

Аспекты изобретения включают способы лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией ВСМА, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективной дозы полиспецифического антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой миелому. В некоторых вариантах осуществления миелома представляет собой множественную миелому.

Аспекты изобретения включают способы лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией PSMA, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективной дозы полиспецифического антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак предстательной железы.

Аспекты изобретения включают способы лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективной дозы полиспецифического антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому

(ДККЛ). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой системную красную волчанку (СКВ). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой ревматоидный артрит (РА). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой рассеянный склероз (МС).

Аспекты изобретения включают наборы для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида, содержащие полиспецифическое антитело или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный реагент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный реагент включает химиотерапевтическое лекарственное средство.

Аспекты изобретения включают биспецифические трехцепочечные антителоподобные молекулы, содержащие: первую полипептидную субъединицу, содержащую: переменный домен легкой цепи (VL), содержащий последовательность SEQ ID NO: 43; и константный домен легкой цепи (CL); вторую полипептидную субъединицу, содержащую: переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 42; и константный домен тяжелой цепи (CH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 72 или 73; при этом переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи вместе образуют первый связывающий фрагмент, имеющий специфичность связывания с CD3; и третью полипептидную субъединицу, содержащую: переменную область, содержащую только тяжелые цепи, в одновалентной или двухвалентной конфигурации, которая имеет специфичность связывания с белком, отличным от CD3; и константный домен тяжелой цепи (CH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 54 или 55. В некоторых вариантах осуществления третья полипептидная субъединица содержит переменную область, содержащую только тяжелые цепи, в двухвалентной конфигурации, которая имеет специфичность связывания с ВСМА.

Аспекты изобретения включают биспецифические трехцепочечные антителоподобные молекулы, содержащие: первую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 49; вторую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 56; и третью полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 58.

Аспекты изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие описанную в данном документе трехцепочечную антителоподобную молекулу, полинуклеотиды, кодирующие описанную в данном документе трехцепочечную антителоподобную молекулу, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки, содержащие такие векторы.

Аспекты изобретения включают способы получения трехцепочечной антителоподобной молекулы, описанной в данном документе, включающие выращивание клетки, описанной в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии трехцепочечной антителоподобной молекулы, и выделение трехцепочечной антителоподобной молекулы из клетки.

Аспекты изобретения включают способы лечения, включающие введение нуждающемуся индивиду эффективной дозы трехцепочечной антителоподобной молекулы, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

Аспекты изобретения включают применение трехцепочечной антителоподобной молекулы, описанной в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида.

Аспекты изобретения включают способы лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией ВСМА, включающие введение индивиду, нуждающемуся в этом, эффективной дозы трехцепочечной антителоподобной молекулы или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой миелому. В некоторых вариантах осуществления миелома представляет собой множественную миелому.

Аспекты изобретения включают наборы для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида, содержащие трехцепочечную антителоподобную молекулу, или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный реагент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный реагент включает химиотерапевтическое лекарственное средство.

Данные и другие аспекты будут дополнительно объяснены в остальной части описания, включая примеры.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1, панели А-С, показаны различные полиспецифические антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 2, панели А-В, показаны изображения анализов методом ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях различных молекул антител, очищенных с помощью хроматографии на основе белка А.

На фиг. 3, панели А, показано изображение анализа методом ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях различных молекул антител, очищенных с помощью хроматографии на основе белка А. На панели В показано изображение анализа методом ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях тех же молекул антител, что и на панели А.

На фиг. 4, панели А-Д представлены графики, изображающие взаимодействия Fc-гамма-рецептор-антитело для различных молекул антител IgG1 в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 5, панели А-Е представлены графики, изображающие взаимодействия Fc-гамма-рецептор-антитело для различных молекул антител IgG4 в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 6, панели А-Д представлены графики, изображающие взаимодействия Fc-гамма-рецептор-антитело для различных молекул антител IgG1 в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 7, панели А-Е представлены графики, изображающие взаимодействия Fc-гамма-рецептор-антитело для различных молекул антител IgG4 в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 8, панели А, представлен график, демонстрирующий связывание клеток с PSMA человека. На фиг. 8, панели В, представлен график, демонстрирующий связывание клеток с PSMA яванского макака.

На фиг. 9 представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток с использованием нестимулированных Т-клеток.

На фиг. 10 представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток с использованием предварительно активированных Т-клеток.

На фиг. 11 представлен график, изображающий процент специфического лизиса PSMA-отрицательных клеток DU145 в зависимости от концентрации полиспецифических антител в присутствии предварительно активированных Т-клеток.

На фиг. 12 представлен график, демонстрирующий связывание биспецифических антител к PSMAxCD3 с положительными и отрицательными по PSMA клетками.

На фиг. 13 представлен график, демонстрирующий опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток.

На фиг. 14, панели А, представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток в зависимости от концентрации антитела. На панели В представлен график, изображающий высвобождение цитокина (IFN- $\gamma$ ) в зависимости от концентрации антитела. На панели С, представлен график, изображающий высвобождение цитокина (IL-2) в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 15, панели А, представлен график, изображающий пролиферацию Т-клеток в зависимости от концентрации антитела. На панели В представлен график, изображающий пролиферацию Т-клеток в зависимости от концентрации антитела. На панели С представлен график, изображающий отношение CD8 к CD4 для пролиферированных Т-клеток. На панели D представлен график, изображающий отношение CD8 к CD4 для пролиферированных Т-клеток.

На фиг. 16 представлен график, изображающий ингибирование роста опухоли 22Rv1 в модели ксенотрансплантата опухоли.

На фиг. 17 представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для биспецифических антител, приведенных в легенде.

На фиг. 18 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для биспецифических антител, приведенных в легенде.

На фиг. 19 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для биспецифических антител, приведенных в легенде.

На фиг. 20 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для биспецифических антител, приведенных в легенде.

На фиг. 21, панели А-D, представлено несколько графиков, изображающих опосредованный биспецифическим антителом лизис опухолевых клеток. Биспецифические антитела к CD3xBCMA анализировали на способность уничтожать три различные BCMA+ опухолевые клетки и одну BCMA-отрицательную линию клеток посредством перенаправления активированных первичных Т-клеток. В этом эксперименте опухолевые клетки смешивали с активированными пан-Т-клетками в соотношении 10:1 Е:Т вместе с добавлением биспецифического антитела. На панели А показано уничтожение клеток RPMI-8226, на панели В показано уничтожение клеток NCI-H929, на

панели С показано уничтожение клеток U-266, а на панели D показано уничтожение клеток K562, отрицательный контроль. По оси X показана концентрация использованного антитела, а по оси Y показан % лизиса опухолевых клеток через 6 часов после добавления антитела.

На фиг. 22, панели A-D, представлено несколько графиков, изображающих опосредованное биспецифическим антителом высвобождение IL-2. Уровень высвобождения цитокина IL-2 измеряли после того, как покоящиеся Т-клетки человека культивировали с различными линиями опухолевых клеток и возрастающими дозами биспецифического антитела к CD3xBCMA. На панели A показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками RPMI-8226, на панели B показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками NCI-H929, на панели C показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками U-266, а на панели D показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками K562, отрицательный контроль.

На фиг. 23, панели A-D, представлено несколько графиков, изображающих опосредованное биспецифическим антителом высвобождение IFN- $\gamma$ . Уровень высвобождения цитокина IFN- $\gamma$  измеряли после того, как покоящиеся Т-клетки человека культивировали с различными линиями опухолевых клеток и возрастающими дозами биспецифического антитела к CD3xBCMA. На панели A показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками RPMI-8226, на панели B показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками NCI-H929, на панели C показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками U-266, а на панели D показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками K562, отрицательный контроль.

На фиг. 24 показано изображение анализа методом ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях различных молекул антител, очищенных с помощью хроматографии на основе белка А.

На фиг. 25 представлена таблица, демонстрирующая % ВМВ молекул, % мономеров и % НМВ молекул из образцов указанных конструкций после очистки.

На фиг. 26, панели A-D, представлены графики, изображающие взаимодействия Fc-гамма-рецептор-антитело для различных молекул антител IgG4 в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 27, панели A и B, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель A) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель B) в зависимости от концентрации биспецифических антител к CD3xBCMA, приведенных в легенде.

На фиг. 28, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифических антител к CD3xBCMA, приведенных в легенде.

На фиг. 29, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифического антитела к CD3xBCMA, приведенных в легенде.

На фиг. 30, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифических антител к CD3xPSMA, приведенных в легенде.

На фиг. 31, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифических антител к CD3xPSMA, приведенных в легенде.

На фиг. 32, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифического антитела к CD3xPSMA, приведенных в легенде.

На фиг. 33, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифического антитела к CD3xCD19, приведенных в легенде.

На фиг. 34, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифического антитела к CD3xCD19, приведенных в легенде.

На фиг. 35, панели А и В, представлены графики, изображающие %CD4+CD69+ Т-клеток (панель А) и %CD8+CD69+ Т-клеток (панель В) в зависимости от концентрации биспецифического антитела к CD3xCD19, приведенных в легенде.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

При практическом осуществлении настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие способы подробно описаны в литературе, например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al.,

2001); Harlow, Lane and Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1*, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); и Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

Если не указано иное, остатки антител в данном документе нумеруются в соответствии с системой нумерации по Kabat (например, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Для обеспечения полного понимания настоящего изобретения в нижеследующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может применяться на практике и без одной или более указанных конкретных деталей. В других случаях общеизвестные отличительные признаки и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны во избежание затруднения понимания изобретения.

Все приведенные в данном документе ссылки, включая патентные заявки и публикации, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

## I. Определения

Под термином «содержащий» подразумевается, что перечисленные элементы требуются для композиции/способа/набора, однако для формирования композиции/способа/набора и тому подобного в рамках формулы изобретения могут быть включены и другие элементы.

Под термином «состоящий по существу из» подразумевается ограничение рамок описанной композиции или способа указанными материалами или поэтапными действиями, не оказывающими существенного влияния на основную и новую характеристику(-и) объекта изобретения.

Под термином «состоящий из» подразумевается исключение любого элемента, поэтапного действия или ингредиента, не указанного в формуле изобретения, из композиции, способа или набора.

Остатки антител в данном документе нумеруются в соответствии с системой нумерации Kabat и системой нумерации EU. Система нумерации Kabat, как правило, используется для обозначения остатка в переменном домене (приблизительно остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «индекс EU», как правило, используется для обозначения аминокислотного остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, представленный в Kabat et al., ранее). «Индекс EU в соответствии с Kabat» относится к нумерации остатков EU человеческого антитела IgG1. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в переменном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации Kabat. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU.

«Антитело» или «иммуноглобулин» относится к молекуле, содержащей по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, где амино-концевой домен тяжелой и легкой цепей имеет переменную последовательность, поэтому его, как правило, называют переменным доменом, или переменный домен тяжелой цепи (VH) или переменный домен легкой цепи (VL). Эти два домена, как правило, связываются с образованием области специфического связывания, хотя, как будет обсуждаться в данном документе, специфическое связывание также может быть получено с переменными последовательностями только тяжелых цепей, а в данной области техники известный и используются различные неестественные конфигурации антител.

«Функциональное» или «биологически активное» антитело или антигенсвязывающая молекула (включая антитела, содержащие только тяжелые цепи, и полиспецифические (например, биспецифические) трехцепочечные антителоподобные молекулы (ТСА, описанные в данном документе)) является молекулой, способной оказывать одно или более своих природных активностей действий в структурных, регуляторных, биохимических или биофизических событиях. Например, функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, может обладать способностью специфически связывать антиген, а связывание может, в свою очередь, вызывать или изменять клеточное или молекулярное событие, такое как передача сигнала или ферментативная активность. Функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, также может блокировать лигандную активацию рецептора или

действовать в качестве агониста или антагониста. Способность антитела или другой связывающей молекулы, например, ТСА, проявлять одну или более своих природных активностей, зависит от нескольких факторов, включая правильный фолдинг и сборку полипептидных цепей.

Термин «антитело» может относиться к полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи, интактной молекуле иммуноглобулина; или иммунологически активной части любого из этих полипептидов, то есть к полипептиду, который содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген представляющей интерес мишени или ее часть, причем такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые вырабатывают аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Описанный в данном документе иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина, включая сконструированные подклассы с измененными Fc-частями, которые обеспечивают снижение или усиление активности эффекторных клеток. Легкие цепи рассматриваемых антител могут быть легкими цепями каппа (V-каппа) или легкими цепями лямбда (V-лямбда). Иммуноглобулины могут быть получены из любых видов. В одном аспекте иммуноглобулин имеет преимущественно человеческое происхождение.

Термин «моноклональное антитело» в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одиночной детерминанты на антигене. Моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены гибридным методом, впервые описанным в Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, а также могут быть получены при помощи методов получения рекомбинантных белков (см., например, патент США № 4816567).

Термин «вариабельный», используемый в связи с антителами, относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов антител значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время

вариабельность не является равномерно распределенной по вариабельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями. Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, преимущественно принимающих конфигурацию бета-складки, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру бета-складки, а в некоторых случаях – образующие часть структуры бета-складки. Гипервариабельные области каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гипервариабельными областями другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Термин «гипервариабельная область» при применении в данном документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из «определяющей комплементарности области» или «CDR» (например, остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из остатков «гипервариабельной петли» 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia и Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления «CDR» означает определяющую комплементарность область антитела, как определено в Lefranc, MP et al., *IMGT, the international ImMunoGeneTics database, Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области/CDR, как определено в данном документе.

Примерные обозначения CDR показаны в данном документе, однако специалисту в данной области техники будет понятно, что обычно используется ряд определений CDR, включая определение по Kabat (см. “Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.» *Mol Immunol.* 2010;47:694-700), которое основано на изменчивости последовательности и является

наиболее часто используемым. Определение Чотиа основано на расположении областей замкнутой структуры (Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature*. 1989; 342:877-883). Представляющие интерес альтернативные определения CDR включают, без ограничения, те, которые раскрыты Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol*. 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes." *J Immunol*. 2008;181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit*. 2004;17:132-143; и Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J*. 1995;9:133-139, содержание каждого из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Термины «антитело, содержащее только тяжелые цепи» и «антитело, состоящее из тяжелых цепей» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к антителам, или одной или более частям антитела, например, одному или более плечам антитела, в которых отсутствует легкая цепь обычного антитела. Термины, в частности, включают, без ограничения, гомодимерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен VH и константные домены CH2 и CH3, в отсутствие домена CH1 функциональные (антигенсвязывающие) варианты таких антител, растворимые варианты VH, Ig-NAR, содержащие гомодимер одного вариабельного домена (V-NAR) и пяти С-подобных константных доменов (C-NAR), и их функциональные фрагменты; и растворимые однодоменные антитела (sUniDab™). В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена вариабельной области, состоящего из каркасной области 1, CDR1, каркасной области 2, CDR2, каркасной области 3, CDR3 и каркасной области 4. В еще одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена по меньшей мере части шарнирной области и доменов CH2, и CH3. В еще одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена по меньшей мере части шарнирной области и домена CH2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена CH3. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, у которых домен CH2 и/или CH3 укорочен, также включены в данный документ. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего

домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но без шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи дисульфидно связаны друг с другом, ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но также в данном документе включены антитела, относящиеся к другим подклассам, таким как подкласс IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности подтип IgG1. В одном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, в данном документе используются в качестве связывающего (нацеливающего) домена химерного антигенного рецептора (CAR). Определение конкретно включает человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые крысами, трансгенными по иммуноглобулину человека, (UniRat™), называемые UniAb™. Варибельные области (VH) UniAb™ называют UniDabs™, и являются универсальными строительными блоками, которые могут быть связаны с областями Fc или сывороточным альбумином для разработки новых терапевтических средств с полиспецифичностью, повышенной эффективностью и увеличенным периодом полужизни. Поскольку гомодимерные UniAb™ легкой цепи и, следовательно, домена VL, антиген распознается одним единственным доменом, то есть варибельным доменом тяжелой цепи антитела, содержащего только тяжелые цепи (VH или VHH).

Используемый в данном документе термин «интактная цепь антитела» представляет собой цепь, содержащую полноразмерную варибельную область и полноразмерную константную область (Fc). Интактное «стандартное» антитело содержит интактную легкую цепь и интактную тяжелую цепь, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, СН1, шарнир, СН2 и СН3 для секретируемого IgG. Другие изоотипы, такие как IgM или IgA, могут иметь разные домены СН. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или их варианты аминокислотной последовательности. Интактное антитело может иметь одну или более «эффекторных функций», которые относятся к той биологической активности, которая присуща константной области Fc (области Fc с нативной последовательностью или области Fc с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; и снижение количества рецепторов клеточной поверхности. Варианты константной области

включают те, которые изменяют эффекторный профиль, связывание с Fc-рецепторами и т.п.

В зависимости от аминокислотной последовательности Fc (константного домена) их тяжелых цепей, антитела и различные антигенсвязывающие белки могут быть определены в разные классы. Существует пять основных классов областей Fc тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены Fc, которые соответствуют различным классам антител, могут обозначаться  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , и  $\mu$ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Формы Ig включают шарнирные модификации или бесшарнирные формы (Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083- 4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Легкие цепи антител от любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух типов, называемых  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут содержать последовательности легкой каппа-цепи или последовательности легкой лямбда-цепи.

«Функциональная область Fc» обладает «эффекторной функцией» области Fc с нативной последовательностью. Неограничивающие примеры эффекторных функций включают связывание C1q; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; АЗКФ; снижение количества рецепторов на поверхности клетки (например, В-клеточного рецептора) и т.д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы область Fc взаимодействовала с рецептором, например, рецепторами Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB1, Fc $\gamma$ RIIB2, Fc $\gamma$ RIIA; Fc $\gamma$ RIIB и FcRn с низкой аффинностью; и могут быть оценены с помощью различных анализов, известных в данной области техники. «Мертвый» или «подвергнутый сайленсингу» Fc представляет собой тот, который был мутирован для сохранения активности в отношении, например, продления периода полужизни в сыворотке, но который не активирует Fc-рецептор с высокой аффинностью, или который имеет пониженную аффинность к Fc-рецептору.

«Область Fc с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. Человеческие области Fc с нативной последовательностью включают, например, область Fc человеческого IgG1 с нативной последовательностью (не-A- и A-аллотипы); область Fc человеческого IgG2 с нативной последовательностью;

область Fc человеческого IgG3 с нативной последовательностью; и область Fc человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

«Вариант области Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности области Fc с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной модификации аминокислоты, предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно вариант области Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с областью Fc нативной последовательности или областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен, таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в области Fc нативной последовательности или в области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc в данном документе предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% гомологией с областью Fc с нативной последовательностью и/или с областью Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% гомологии с ними, более предпочтительно по меньшей мере около 95 % гомологии с ним.

Аминокислотная последовательность человеческого Fc IgG4 (UniProtKB № P01861) представлена в данном документе как SEQ ID NO: 45. Подвергнутый сайленсингу IgG1 описан, например, в Boesch, A.W., et al., «Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions». MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27, описание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Возможны и другие варианты Fc, включая, без ограничения, вариант, в котором удалена область, способная образовывать дисульфидную связь, или в котором удалены определенные аминокислотные остатки на N-конце нативного Fc, или остаток метионина добавлен к нему. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления одна или более Fc-частей антитела могут содержать одну или более мутаций в шарнирной области для устранения дисульфидной связи. В еще одном варианте осуществления шарнирная область Fc может быть удалена полностью. В еще одном варианте осуществления антитело может содержать вариант Fc.

Кроме того, вариант Fc может быть сконструирован для удаления или существенного снижения эффекторных функций путем замены (мутации), удаления или добавления аминокислотных остатков для осуществления связывания комплемента или связывания Fc-рецептора. Например, без ограничения, делеция может происходить в сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q. Способы получения таких производных последовательностей Fc-фрагмента иммуноглобулина описаны в международных патентных публикациях №№ WO 97/34631 и WO 96/32478. Кроме того,

Fc-домен может быть модифицирован фосфорилированием, сульфированием, ацилированием, гликозилированием, метилированием, фарнезилированием, ацетилированием, амидированием и т.п.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариантную последовательность домена CH3 IgG4 человека, содержащую мутацию T366W, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью выступа CH3 IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариантную последовательность домена CH3 IgG4 человека, содержащую мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью впадины CH3 IgG4. Мутации CH3 IgG4, описанные в данном документе, можно использовать любым подходящим образом, чтобы поместить «выступ» на первой константной области тяжелой цепи первого мономера в димере антитела и «впадина» на второй константной области тяжелой цепи второго мономера в димере антитела, тем самым облегчая правильное спаривание (гетеродимеризацию) желаемой пары полипептидных субъединиц тяжелой цепи в антителе.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариантную область Fc IgG4 человека, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариантную область Fc IgG4 человека, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина).

Термин «антитело, содержащее область Fc» относится к антителу, которое содержит область Fc. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время очистки антитела или путем конструирования рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Соответственно, антитело, имеющее область Fc согласно данному изобретению, может включать антитело с или без K447.

Аспекты изобретения включают антитела, содержащие переменную область только тяжелой цепи, в одновалентной или двухвалентной конфигурации. Используемый в данном документе термин «одновалентная конфигурация», используемый в отношении домена переменной области только тяжелой цепи, означает, что присутствует только один домен переменной области только тяжелой цепи, имеющий единственный сайт связывания (см. фиг. 1, панель А, правая часть антитела). Напротив, термин «двухвалентная конфигурация», используемый в отношении домена переменной

области только тяжелой цепи, означает, что присутствуют два домена вариабельной области только тяжелой цепи (каждый из которых имеет один сайт связывания) и соединены линкерной последовательностью (см. фиг. 1, панели В и С, правые плечи антител). Неограничивающие примеры линкерных последовательностей дополнительно обсуждаются в данном документе и включают, без ограничения, последовательности GS различной длины. Когда вариабельная область только тяжелой цепи имеет двухвалентную конфигурацию, каждый из двух доменов вариабельной области только тяжелой цепи может иметь аффинность связывания с одним и тем же антигеном или с разными антигенами (например, с разными эпитопами на одном и том же белке; с двумя разными белками и т.д.). Однако, если специально не указано иное, вариабельная область только тяжелой цепи, обозначенная как находящаяся в «двухвалентной конфигурации», как предполагается, содержит два идентичных домена вариабельной области только тяжелой цепи, соединенные линкерной последовательностью, при этом каждая из двух идентичных доменов вариабельных областей только тяжелой цепи, обладают аффинностью связывания с одним и тем же целевым антигеном.

Аспекты изобретения включают антитела, имеющие полиспецифические конфигурации, которые включают, без ограничения, биспецифические, триспецифические и т.д. Большое разнообразие способов и конфигураций белков известно и используется для получения биспецифических моноклональных антител (бсмаАт), триспецифических антител, и т.п.

Были разработаны различные способы получения поливалентных искусственных антител путем рекомбинантного слияния вариабельных доменов двух или более антител. В некоторых вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающий домен на полипептиде соединены полипептидным линкером. Одним неограничивающим примером такого полипептидного линкера является GS-линкер, имеющий аминокислотную последовательность из четырех остатков глицина, за которыми следует один остаток серина, и в котором последовательность повторяется  $n$  раз, где  $n$  представляет собой целое число от 1 до около 10, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Неограничивающие примеры таких линкеров включают GGGGS (SEQ ID NO: 70) ( $n=1$ ) и GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 71) ( $n=2$ ). Также можно использовать другие подходящие линкеры, которые описаны, например, в Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 October 15; 65(10): 1357-69, описание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Термин «трехцепочечная антителоподобная молекула» или «ТСА» используется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, содержащих, состоящих по существу или состоящих из трех полипептидных субъединиц, две из которых

содержат, состоят по существу из или состоят из одной тяжелой и одной легкой цепи моноклонального антитела, или функциональных антигенсвязывающих фрагментов таких цепей антитела, содержащих антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН. Данная пара тяжелая цепь / легкая цепь обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена. Третья полипептидная субъединица включает, состоит по существу из или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащую домены СН2 и/или СН3, и/или СН4, в отсутствие домена СН1 и один или более антигенсвязывающих доменов (например, два антигенсвязывающих домена), который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, причем такой связывающий домен получен из или имеет идентичность последовательности с вариабельной областью тяжелой или легкой цепи антитела. Части такой вариабельной области могут кодироваться сегментами гена  $V_H$  и/или  $V_L$ , сегментами гена  $D$  и  $J_H$ , или сегментами гена  $J_L$ . Вариабельные области могут кодироваться реаранжированными сегментами генов  $V_HDJ_H$ ,  $V_LDJ_H$ ,  $V_HJ_L$ , или  $V_LJ_L$ .

В связывающем соединении ТСА используется «антитело, содержащее только тяжелые цепи», или «антитело, состоящее только из тяжелых цепей», или «полипептид, содержащий только тяжелые цепи», которые, как используется в данном документе, означают одноцепочечное антитело, содержащее константные области тяжелой цепи СН2 и/или СН3, и/или СН4, но без домена СН1. В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов СН2, и СН3. В еще одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, у которых домен СН2 и/или СН3 укорочен, также включены в данный документ. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но без шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью, другие в противном случае ковалентно или нековалентно связаны друг с другом, и может необязательно включать асимметричную поверхность взаимодействия между одним или более доменами СН, чтобы облегчить правильное спаривание между полипептидными цепями. Антитело из тяжелых цепей может принадлежать к подклассу IgG, но сюда также включены антитела, принадлежащие

к другим подклассам, таким как подкласс IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности подтипу IgG1 или подтипу IgG4. Неограничивающие примеры соединения, связывающего ТСА, описаны, например, в WO2017/223111 и WO2018/052503, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела, состоящий только из тяжелых цепей составляют около четверти антител IgG, продуцируемых животными семейства верблюдовых, например, верблюдами и ламами (Hamers-Casterman C., et al. *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Эти антитела образованы двумя тяжелыми цепями, но лишены легких цепей. Как следствие, вариабельный участок связывания антигена называется доменом VHH, и он представляет собой наименьший естественный, интактный антигенсвязывающий сайт, имеющий длину всего около 120 аминокислот (Desmyter, A., et al. *J. Biol. Chem.* 276, 26285- 26290 (2001)). Антитела, содержащие только тяжелые цепи, с высокой специфичностью и аффинностью могут генерироваться против различных антигенов посредством иммунизации (van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)) и часть VHH может быть легко клонирована и экспрессирована в дрожжевых грибах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). Также было показано, что у акул есть один VH-подобный домен в своих антителах, называемый VNAR. (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

Термин «CD3» относится к белковому мультисубъединичному комплексу CD3 человека. Мультисубъединичный комплекс белка CD3 состоит из 6 различных полипептидных цепей. Они включают цепь CD3 $\gamma$  (SwissProt P09693), цепь CD3 $\delta$  (SwissProtP04234), две цепи CD3 $\alpha$  (SwissProt P07766), и одну цепь гомодимера CD3 (SwissProt 20963), и которая ассоциирована с альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора. Термин «CD3» включает в себя любой вариант CD3, изоформу и гомолог в других видах, которые экспрессируются естественным образом в клетках (включая Т-клетки) или может быть экспрессирован на клетках трансфицированных генами или кДНК, кодирующей указанные пептиды, если не указано иное.

«Антитело к ВСМА x CD3» представляет собой полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, такое как биспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое содержит две различные антигенсвязывающие области,

одна из которых специфически связывается с антигеном ВСМА, а другая специфически связывается с антигеном CD3. «Антитело к PSMA x CD3» представляет собой полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, такое как биспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое содержит две разные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном PSMA, а другая специфически связывается с антигеном CD3. «Антитело к CD19 x CD3» представляет собой полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, такое как биспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое содержит две различные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном CD19, а другая специфически связывается с антигеном CD3.

Используемый в данном документе термин «ВСМА» относится к антигену созревания В-клеток человека, также известному как ВСМА, CD269 и TNFRSF17 (UniProt Q02223), который является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, преимущественно экспрессируемых в дифференцированных плазматических клетках. Внеклеточный домен ВСМА состоит, согласно UniProt, из аминокислот 1–54 (или 5–51).

Термины «антитело к ВСМА, содержащее только тяжелые цепи» и «антитело против ВСМА, содержащее только тяжелые цепи» используются в данном документе для обозначения антитела, содержащего только тяжелые цепи, как определено выше, которое иммуноспецифически связывается с ВСМА.

Используемый в данном документе термин «PSMA» относится к трансмембранному белку типа II, который обладает активностью N-ацетилированной альфа-связанной кислой дипептидазы, фолатгидролазы и дипептидилпептидазы. Термин «PSMA» включает белок PSMA человека и любого отличного от человека вида животных и, в частности, включает PSMA человека, а также PSMA отличных от человека млекопитающих.

Используемый в данном документе термин «PSMA человека» включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи PSMA человека (UniProt Q04609), независимо от его источника или способа получения. Таким образом, «PSMA человека» включает PSMA человека, естественно экспрессируемый клетками, и PSMA, экспрессируемый на клетках, трансфицированных геном PSMA человека.

Термины «антитело, содержащее только тяжелые цепи, к PSMA», «антитело, состоящее только из тяжелых цепей, к PSMA», «анти-PSMA антитело, содержащее только тяжелые цепи» и «антитело к PSMA, состоящее только из тяжелых цепей» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего только

тяжелые цепи, как определено выше, для иммуноспецифического связывания с PSMA, включая PSMA человека, как определено выше. Определение включает, без ограничения, человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, включая UniRat™, продуцирующие человеческие антитела UniAb™ к PSMA как определено выше.

Термины «CD19» и «кластер дифференцировки 19» в контексте данного документа относятся к молекуле, экспрессируемой во всех фазах развития В-клеток до терминальной дифференцировки в плазматические клетки. Термин «CD 19» включает белок CD19 человека и любого вида отличного от человека животного и, в частности, включает CD19 человека, а также CD19 отличных от человека млекопитающих.

Используемый в данном документе термин «CD19 человека» включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD19 человека (UniProt P15391), независимо от его источника или способа получения. Таким образом, «CD19 человека» включает CD19 человека, естественно экспрессируемый клетками, и CD19, экспрессируемый на клетках, трансфицированных геном CD19 человека.

Термины «антитело к CD19, содержащее только тяжелые цепи», «антитело к CD19, состоящее только из тяжелых цепей», «анти-CD19 антитело, содержащее только тяжелые цепи» и «антитело к CD19, состоящее только из тяжелых цепей» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего только тяжелые цепи, как определено выше, для иммуноспецифического связывания с CD19, включая CD19 человека, как определено выше. Определение включает, без ограничения, человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, включая UniRat™, продуцирующие человеческие антитела к CD19 UniAb™, как определено выше.

«Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами,

которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей данного изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей генерируются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2.

«Выделенным» антителом является такое, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественной среды. Загрязняющий компонент естественного окружения представляет собой вещества, которые влияют на диагностическое или терапевтическое применение антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более 95% по массе антитела, как определено методом Лоури, и наиболее предпочтительно более 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности путем ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием красителя Кумасси синего или, предпочтительнее, красителя на основе серебра. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Антитела по изобретению включают полиспецифические антитела. Полиспецифические антитела имеют более чем одну специфичность связывания. Термин «полиспецифический», в частности, включает «биспецифический» и «триспецифический», а также аффинность независимого специфического связывания высшего порядка, такую как полиэпитопная специфичность высшего порядка, а также тетравалентные антитела и фрагменты антител. Термины «полиспецифическое антитело», «полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи», «полиспецифическое антитело, состоящее только из тяжелых цепей» и «полиспецифическое антитело UniAb™» используются в данном документе в самом широком смысле и охватывают все антитела с более чем одной специфичностью связывания.

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися

эпитопами на белке ВСМА, белке PSMA или белке CD19, таком как белок ВСМА человека, белок PSMA человека или белок CD 19 человека (т.е. двухвалентный и бипаратопный). Полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке ВСМА, белке PSMA или белке CD19, таком как белок ВСМА человека, белок PSMA человека или белок CD19 человека и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как CD3 человека (т.е. двухвалентный и бипаратопный). Полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися или частично перекрывающимися эпитопами на белке ВСМА, белке PSMA или белке CD19, таком как белок ВСМА человека, белок PSMA человека или белок CD19 человека, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как белок CD3 человека (т.е. трехвалентный и бипаратопный).

«Эпитоп» представляет собой участок на поверхности молекулы антигена, с которым связывается одна молекула антитела. Обычно антиген имеет несколько или много разных эпитопов и вступает в реакцию со многими различными антителами. Термин, в частности, включает линейные эпитопы и конформационные эпитопы.

«Эпитопное картирование» представляет собой процесс идентификации сайтов связывания или эпитопов антител на их целевых антигенах. Эпитопы антител могут быть линейными или конформационными эпитопами. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин «полиэпитопная специфичность» относится к способности специфически связываться с двумя или более различными эпитопами на одной или разных мишенях. Как отмечено выше, настоящее изобретение конкретно включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, с полиэпитопной специфичностью, т.е. антитела, содержащие только тяжелые цепи, связывающиеся с одним или более неперекрывающимися эпитопами на белке ВСМА, белке PSMA или белке CD19, таком как белок ВСМА человека, белок PSMA человека или белок CD19 человека; и антитела, содержащего только тяжелые цепи, связывающиеся с одним или более эпитопами на белке ВСМА, белке PSMA или белке CD19 и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3. Термин «неперекрывающийся эпитоп(-ы)» или «неконкурентный эпитоп(-ы)» антигена определяется в данном документе как означающий эпитоп(-ы), которые распознаются

одним членом пары антигенспецифических антител, но не другим членом. Пары антител или антигенсвязывающие области, нацеленные на один и тот же антиген на полиспецифическом антителе, распознающие неперекрывающиеся эпитопы, не конкурируют за связывание с этим антигеном и способны одновременно связывать этот антиген.

Антитело связывает «по существу тот же эпитоп», что и эталонное антитело, когда два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко используемыми и быстрыми способами для определения того, связываются ли два эпитопа с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются анализы конкурентного связывания, которые могут быть сконфигурированы во всем количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизуют в 96-луночной планшете, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток.

Термин «валентный», в контексте данного документа, относится к указанному количеству сайтов связывания в молекуле антитела.

«Одновалентное» антитело имеет один сайт связывания. Таким образом, одновалентное антитело также является моноспецифическим.

«Поливалентное» антитело имеет два или более сайтов связывания. Таким образом, термины «двухвалентный», «трехвалентный» и «четырёхвалентный» относятся к наличию двух сайтов связывания, трех сайтов связывания и четырех сайтов связывания, соответственно. Таким образом, биспецифическое антитело по изобретению является по меньшей мере двухвалентным и может быть двухвалентным, четырехвалентным или иным образом многовалентным. Двухвалентное антитело в соответствии с вариантами осуществления изобретения может иметь два сайта связывания с одним и тем же эпитопом (т.е. двухвалентное, монопаратопное) или с двумя разными эпитопами (т.е. двухвалентное, бипаратопное).

Известно большое разнообразие способов и конфигураций белка и используется для получения биспецифических моноклональных антител (бсмкАт), триспецифических антител и тому подобного.

Термин «трехцепочечная антителоподобная молекула» или «ТСА» используется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, включающих, состоящих по существу или состоящих из трех полипептидных субъединиц, две из которых содержат, состоят по существу из или состоят из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи моноклонального антитела, или функциональных антигенсвязывающих фрагментов таких

цепей антитела, содержащих антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН. Данная пара тяжелая цепь / легкая цепь обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена. Третья полипептидная субъединица содержит, состоит по существу или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащий домены СН2 и/или СН3, и/или СН4, в отсутствие домена СН1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, причем такой связывающий домен происходит из или имеет идентичность последовательности с вариабельной областью тяжелой или легкой цепи антитела. Части такой вариабельной области могут кодироваться сегментами гена  $V_H$  и/или  $V_L$ , сегментами гена  $D$  и  $J_H$ , или сегментами гена  $J_L$ . Вариабельные области могут кодироваться реаранжированными сегментами генов  $V_HDJ_H$ ,  $V_LDJ_H$ ,  $V_HJ_L$ , или  $V_LJ_L$ . В белке ТСА используется антитело, содержащее только тяжелые цепи, как определено выше.

Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» используется в данном описании в самом широком смысле для обозначения сконструированного рецептора, который прививает желаемую специфичность связывания (например, антигенсвязывающую область моноклонального антитела или другого лиганда) к трансмембранному и внутриклеточному сигнальному доменам. Как правило, рецептор используется для прививки специфичности моноклонального антитела на Т-клетку для создания химерных антигенных рецепторов (CAR). (J Natl Cancer Inst, 2015; 108(7):dvj439; и Jackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13:370-383). CAR-T-клетки представляют собой Т-клетки, которые были генетически модифицированы для продукции искусственного Т-клеточного рецептора для применения в иммунотерапии. В одном варианте осуществления «CAR-T-клетка» означает терапевтическую Т-клетку, экспрессирующую трансген, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов, состоящих минимально из внеклеточного домена, трансмембранного домена и по меньшей мере одного цитозольного домена.

Термин «человеческое антитело» используется в данном документе для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела по данному документу могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека, например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*. Термин «человеческое антитело», в частности, включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, имеющие

последовательности варьируемой области тяжелой цепи человека, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или мыши, в частности UniAbs™, продуцируемые UniRats™, как определено выше.

Под «химерным антителом» или «химерным иммуноглобулином» подразумевается молекула иммуноглобулина, содержащая аминокислотные последовательности по меньшей мере из двух разных локусов Ig, например, трансгенное антитело, содержащее часть, кодируемую локусом Ig человека, и часть, кодируемую локусом Ig крысы. Химерные антитела включают трансгенные антитела с нечеловеческими областями Fc или искусственными областями Fc, и человеческие идиотипы. Такие иммуноглобулины могут быть выделены из животных согласно изобретению, которые были сконструированы для получения таких химерных антител.

Используемый в данном документе термин «эффекторная клетка» относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от когнитивной и активационной фаз иммунного ответа. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, такая как естественная клетка-киллер, способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Например, моноциты и макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток-мишеней и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы или связывании с клетками, которые презентуют антигены. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень или клетку-мишень.

«Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют рецепторы, такие как Т-клеточные рецепторы или FcR, и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно, такие клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают, естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем NK-клетки являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови или РВМС, как описано в данном документе.

Термин «иммунная клетка» используется в данном документе в самом широком смысле, включая, без ограничения, клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры (NK),

макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфно-ядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы.

«Эффекторные функции» антитела относятся к той биологической активности, которая относится к области Fc (области Fc с нативной последовательностью или области Fc с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов поверхности клетки, (например, B-клеточный рецептор, BCR) и т.д.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «АЗКЦ» соответствуют опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только Fc $\gamma$ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. данные по экспрессии FcR на гемопозитических клетках обобщены в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, например, согласно описанию в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

«Комплементзависимая цитотоксичность» или «КЗЦ» относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента, может быть выполнен анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Термин «аффинность связывания» относится к силе суммарных общих нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к

действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом можно выразить константой диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена обычными методами, известными в данной области техники. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно и склонны легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными.

Используемый в данном документе термин «Kd» или «значение Kd» относится к константе диссоциации, определенной методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet QK384 (Fortebio Inc., Менло Парк, штат Калифорния) в кинетическом режиме. Например, сенсоры к мышиным Fc загружают со слитым с мышиным Fc антигеном и затем погружают в лунки, содержащие антитела, для измерения зависимых от концентрации скоростей ассоциации (kon). Скорости диссоциации антител (koff) измеряют на последней стадии, когда сенсоры погружают в лунки, содержащие только буфер. Kd представляет собой соотношение koff/kon. (Подробнее см. Consercion, J, et al., Comb Chem High Throughput Screen, 12(8), 791-800, 2009).

Термины «лечение», «лечить» и тому подобное используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного явления, связанного с этим заболеванием. В контексте данного документа термин «лечение» охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, и включает в себя: (a) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; или (c) облегчение заболевания, т.е. регрессию заболевания. Терапевтический агент может быть введен до, во время или после начала заболевания или травмы. Лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение желательно проводить до полной потери функции в пораженных тканях. Терапия у субъекта может быть проведена во время симптоматической стадии заболевания, и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество активного агента, которое необходимо для придания терапевтического эффекта у субъекта.

Например, «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое вызывает, ослабляет или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, связанных с заболеванием, или которое повышает устойчивость к нарушению.

Используемый в данном документе термин «рак предстательной железы» относится к злокачественной опухоли железистого происхождения в предстательной железе.

Термин «характеризуется экспрессией PSMA» в широком смысле относится к любому заболеванию или нарушению, при котором экспрессия PSMA связана или вовлечена в один или более патологических процессов, которые характерны для данного заболевания или нарушения. Такие нарушения включают, но не ограничиваются ими, рак предстательной железы.

Термины «В-клеточные новообразования» или «зрелые В-клеточные новообразования» в контексте данного изобретения включают, но не ограничиваются ими, все лимфолейкозы и лимфомы, хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников, лейкоз волосковых клеток, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому из мантийных клеток, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДККЛ), множественную миелому, лимфоплазмацитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, плазмклеточное новообразование, например, плазмклеточную миелому, плазмоцитому, болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов, болезнь тяжелых цепей, MALT-лимфому, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоматоидный гранулематоз, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, первичную выпотную лимфому и СПИД-связанную неходжкинскую лимфому.

Термин «характеризуется экспрессией CD19» в широком смысле относится к любому заболеванию или нарушению, при котором экспрессия CD19 связана или вовлечена в один или более патологических процессов, которые характерны для данного заболевания или нарушения. Такие нарушения включают, но не ограничиваются ими, В-клеточные новообразования.

Термин «характеризуется экспрессией BCMA» в широком смысле относится к любому заболеванию или нарушению, при котором экспрессия BCMA связана или

вовлечена в один или более патологических процессов, которые характерны для данного заболевания или нарушения. Такие нарушения включают, но не ограничиваются ими, В-клеточные новообразования.

Термины «субъект», «индивид» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения млекопитающего, которого оценивают на предмет лечения и/или которое подвергается лечению. В одном варианте осуществления млекопитающее является человеком. Термины «субъект», «индивид» и «пациент» охватывают, без ограничения, индивидов, имеющих злокачественное новообразование, индивидов с аутоиммунными заболеваниями, патогенными инфекциями и тому подобное. Субъектами могут быть люди, но также могут быть и другие млекопитающие, в частности те млекопитающие, которые могут быть использованы в качестве лабораторных моделей заболеваний человека, например, мышь, крыса и т.д.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Такие составы являются стерильными. «Фармацевтически приемлемые эксципиенты» (носители, адьюванты) являются таковыми, которые резонно могут вводиться субъекту-млекопитающему и обеспечивать эффективную дозу используемого активного ингредиента.

«Стерильный» состав является асептическим или свободным от, или практически не содержит любых живых микроорганизмов и их спор. «Замороженный» состав представляет собой состав при температуре ниже 0°C.

«Стабильный» состав представляет собой состав, в котором белок в нем по существу сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно, композиция практически полностью сохраняет свою физическую или химическую стабильность, а также свою биологическую активность. Период хранения в общем выбран на основании срока годности состава. Разнообразные техники для измерения стабильности белка известны в данной области техники и рассмотрены, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90) (1993), например. Стабильность может быть измерена при выбранной температуре для выбранного периода времени. Стабильность может быть оценена качественно и/или количественно различными способами, включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной

хроматографии, путем измерения мутности и/или путем визуального контроля); путем оценки гетерогенности заряда с помощью катионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования изображения (icIEF) или электрофореза в капиллярной зоне; анализ N-концевой или C-концевой последовательности; масс-спектрометрический анализ; анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализ пептидной карты (например, триптический или LYS-C); оценку биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.п. Нестабильность может включать одно или более из: агрегации, дезамидирования (например, дезамидирования Asn), окисления (например, окисления Met), изомеризации (например, изомеризации Asp), отсечения / гидролиза / фрагментации (например, фрагментации шарнирной области), образования сукцинимиды, неспаренного цистеина(-ов), удлинения N-конца, процессинга C-конца, различий гликозилирования, и т.п.

## II. Подробное описание

### Антитела к ВСМА

Настоящее изобретение относится к нескольким семействам близкородственных антител, которые связываются с ВСМА человека. Варибельные области антител этих семейств описаны в публикациях патентов США №№ US20190352412, US20200157232 и US20200048348, а также в публикациях PCT №№ WO2018237037 и WO2019006072, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки. Неограничивающий выбор репрезентативных последовательностей варибельных доменов тяжелой цепи антитела к ВСМА представлен ниже в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности варибельного домена антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ВСМА.

Идентификационный номер клона	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
308635	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQA PGKGPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYHCAKQGENDGPFDRGQGLTLTVSS	92
308636	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQPP GKGMEWVSGIRGSDGSTFYADSVKG RFTISRDNATNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKQGGNDGPFDRGQGLTLTVSS	87
308806	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYGMSWVRQAP GKGVEWVSG IRGSDGTTYYADSVKGRFTISRDNSSRNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKQGGNDGPFDRGQGLTLTVSS	88
308837	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAP GKGPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNATNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKQGGNDGPFDRGQGLTLTVSS	89
308902	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQA PGKGPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKQGENDGPFDRGQGLTLTVSS	90

308912	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQPP GKGMWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKQGGNDGPFDRGQGLTVTVSS	91
--------	--	----

Последовательность антитела к ВСМА может быть выбрана из представленных в данном документе для разработки и терапевтических целей или другого применения, включая, без ограничения, применение в качестве полиспецифического, например, биспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления предложены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, ТСА. Биспецифические антитела содержат, по меньшей мере, переменную область тяжелой цепи антитела, специфичного для белка, отличного от ВСМА.

Когда белок по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, одна связывающая часть является специфичной для ВСМА человека, в то время как другая часть может быть специфичной для клеток-мишеней, опухолеассоциированных антигенов, антигенов-мишеней, например, интегринов и т.д., антигенов патогенов, белков контрольных точек, и тому подобное. Клетки-мишени конкретно включают в себя раковые клетки, такие как гематологические опухоли, например В-клеточные опухоли, как описано выше.

В объем изобретения входят различные форматы биспецифических антител, включая, без ограничения, одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и кратные им формы. В данном документе биспецифические антитела конкретно включают биспецифические антитела к Т-клеткам, связывающиеся с ВСМА, который избирательно экспрессируется на плазматических клетках (РС) и множественной миеломе (ММ), а также с CD3 (антитела к ВСМА x CD3). Такие антитела индуцируют сильное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, несущих ВСМА, и могут быть использованы для лечения опухолей, в частности, гемобластозов, таких как В-клеточные опухоли, как обсуждается далее в данном документе.

В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело представляет собой ТСА, содержащую: домен VH к CD3, который спарен с переменным доменом легкой цепи (VL), где домен VH и домен VL вместе имеют аффинность связывания с CD3; переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящего только из тяжелых цепей, имеющего аффинность связывания с ВСМА, в одновалентной или двухвалентной конфигурации; и вариант домена Fc IgG4 человека, содержащий первую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ), и вторую

последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина). Этот вариант или модифицированный домен Fc IgG4 предотвращает нежелательный обмен Fab, снижает эффекторную функцию антитела, а также способствует гетеродимеризации полипептидных субъединиц тяжелой цепи с образованием биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 58, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к BCMA.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь к CD3, содержащую i) SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 59, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к BCMA.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к BCMA, содержащую SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и

тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 58, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 59, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная

двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 58, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую тяжелую цепь к CD3, содержащую i) SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 59, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 58, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 56, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 59, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА,

содержащую SEQ ID NO: 76, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь к CD3, содержащую i) SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическое моноклональное антитело IgG4 человека, содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА), содержащую тяжелую цепь к CD3, содержащую i) SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и тяжелую цепь к ВСМА, содержащую SEQ ID NO: 76, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащую i) тяжелую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 75, ii) легкую цепь к CD3, содержащую SEQ ID NO: 49, и iii) тяжелую цепь к

BCMA, содержащую SEQ ID NO: 77, при этом биспецифическое антитело не содержит легкую цепь к BCMA.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с BCMA человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с BCMA человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с BCMA человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу на основе

моноклонального IgG4 человека (ТСА), содержащее (i) первое связывающее плечо, которое связывается с CD3 человека, и (ii) второе связывающее плечо, которое связывается с ВСМА человека, причем указанное первое связывающее плечо содержит первую тяжелую цепь и легкую цепь, и указанное второе связывающее плечо содержит двухвалентную вторую тяжелую цепь, при этом указанная первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанная двухвалентная вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и при этом указанное второе связывающее плечо не содержит легкую цепь.

#### Антитела к CD19

Настоящее изобретение относится к семейству близкородственных антител, которые связываются с CD19 человека. Варибельные области антител этого семейства описаны в публикации РСТ № WO2020018922, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Последовательность антитела к CD19 может быть выбрана из представленных в данном документе для разработки и терапевтических целей или другого применения, включая, без ограничения, применение в качестве полиспецифического, например, биспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления предложены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, ТСА. Биспецифические антитела содержат, по меньшей мере, варибельную область тяжелой цепи антитела, специфичного для белка, отличного от CD 19.

Когда белок по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, одна связывающая часть является специфичной для CD19 человека, в то время как другая часть может быть специфичной для клеток-мишеней, опухолеассоциированных антигенов, антигенов-мишеней, например, интегринов и т.д., антигенов патогенов, белков контрольных точек, и тому подобное. Клетки-мишени конкретно включают в себя раковые клетки, такие как гематологические опухоли, например В-клеточные опухоли, как описано выше.

В объем изобретения входят различные форматы биспецифических антител, включая, без ограничения, одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и кратные им формы. Биспецифические антитела в данном документе, в частности, включают биспецифические антитела к Т-клеткам, связывающиеся с CD19, который селективно экспрессируется на зрелых В-клетках, и CD3 (антитела к CD19 x CD3). Такие антитела индуцируют сильное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих CD19, и их можно

использовать для лечения опухолей, в частности, гематологических опухолей, таких как В-клеточные опухоли, как обсуждается далее в данном документе.

В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело представляет собой ТСА, содержащую: домен VH к CD3, который спарен с переменным доменом легкой цепи (VL), где домен VH и домен VL вместе имеют аффинность связывания с CD3; переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящего только из тяжелых цепей, имеющего аффинность связывания с CD19, в одновалентной или двухвалентной конфигурации; и вариант домена Fc IgG4 человека, содержащий первую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ), и вторую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина). Этот вариант или модифицированный домен Fc IgG4 предотвращает нежелательный обмен Fab, снижает эффекторную функцию антитела, а также способствует гетеродимеризации полипептидных субъединиц тяжелой цепи с образованием биспецифического антитела.

#### Антитела к PSMA

Настоящее изобретение относится к семейству близкородственных антител, которые связываются с PSMA человека. Примерами антител этого семейства являются представленные последовательности переменной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 24–54, приведенные в таблице 2. Семейства антител обеспечивают ряд преимуществ, которые благоприятствуют применению их в качестве клинического(-их) терапевтического(-их) агента(-ов). Антитела включают членов с диапазоном аффинностей связывания, позволяющих выбирать конкретную последовательность с желаемой аффинностью связывания.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности переменного домена антитела, содержащего только тяжелые цепи, к PSMA.

Идентификационный номер клона	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
325920	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYR GQGTLVTVSS	1
346181	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYR GQGTLVTVSS	2
346165	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSVDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN	3

	CARHKAATADFDYR GQGTLTVSS	
346172	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYR GQGTLTVSS	4
326109	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSNSYWGWIRQSPGKGLE WLGSIYDSGSTHYNPSLKSRTIISGDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC ARHKAATADFDYRG QGTLTVSS	5
325867	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYDSLDIRGQGTLTVSS	6
325742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYDSLDIRGQGTLTVSS	7
325748	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	8
325940	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	9
325836	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGTLTVSS	10
326027	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGTLTVSS	11
326087	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGTLTVSS	12
326084	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYDSSGYSLDIRGQGTLTVSS	13
326028	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGTLTVSS	14
345497	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	15
326029	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRVGYYYETSGYSLDIRGQGTLTVSS	16
345461	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSTSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	17
345493	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	18
345436	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	19
345443	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	20
345490	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGTLTVSS	21
345482	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE	22

	GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	
345485	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	23
345463	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	24
325932	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	25
345505	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKLEG VAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	26
345508	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGPE WVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	27
345480	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	28
326116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYDSSGYDSLDRGQGTLTVSS	29
345509	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	30
345444	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	31
345421	QVQLVESVGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	32
345447	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE GVAVISYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	33
345510	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	34
345438	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGPE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLTVSS	35

В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело представляет собой ТСА, содержащую: домен VH к CD3, который спарен с переменным доменом легкой цепи (VL), где домен VH и домен VL вместе имеют аффинность связывания с CD3; переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящего только из тяжелых цепей, имеющего аффинность связывания с PSMA, в одновалентной или двухвалентной конфигурации; и вариант домена Fc IgG4 человека, содержащий первую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ), и вторую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V

(впадина). Этот вариант или модифицированный домен Fc IgG4 предотвращает нежелательный обмен Fab, снижает эффекторную функцию антитела, а также способствует гетеродимеризации полипептидных субъединиц тяжелой цепи с образованием биспецифического антитела.

#### Трехцепочечные антителоподобные молекулы к CD3 x белку-мишени (ТСА)

В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь / легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении первого антигена (например, CD3), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержит Fc-часть, содержащую домены CH2 и/или CH3 и/или CH4, в отсутствие домена CH1. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь / легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белок CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении BCMA, PSMA, или CD19.

В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело представляет собой ТСА, содержащую: домен VH к CD3, который спарен с переменным доменом легкой цепи (VL), где домен VH и домен VL вместе имеют аффинность связывания с CD3; переменный домен тяжелой цепи антитела, состоящего только из тяжелых цепей, имеющего аффинность связывания с BCMA, PSMA, или CD19; и вариант домена Fc IgG4 человека, содержащий первую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ), и вторую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина). Этот вариант или модифицированный домен Fc IgG4 предотвращает нежелательный обмен Fab, снижает эффекторную функцию антитела, а также способствует гетеродимеризации полипептидных субъединиц тяжелой цепи с образованием биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело содержит CD3-связывающий домен VH, который спарен с переменным доменом легкой цепи. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой фиксированную

легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 36, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 37 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 38, в каркасной области VH человека. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 39, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 40 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 41, в каркасной области VL человека. Вместе CD3-связывающий домен VH и переменный домен легкой цепи имеет аффинность связывания в отношении CD3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 43.

Полиспецифические антитела, содержащие описанный выше CD3-связывающий домен VH и переменный домен легкой цепи, обладают полезными свойствами, например, как описано в публикации PCT № WO2018/052503, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Любые из описанных в данном документе полиспецифических антител и антигенсвязывающих доменов, имеющих аффинность связывания в отношении BCMA, PSMA, или CD19, могут быть объединены с CD3-связывающими доменами и фиксированными доменами легкой цепи, описанными в данном документе, для создания полиспецифических антител, имеющих аффинность связывания в отношении одного или более эпитопов BCMA, эпитопов PSMA или эпитопов CD19, а также в отношении CD3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей к CD3.

	SEQ aa CDR1	SEQ aa CDR2	SEQ aa CDR3
Тяжелая цепь	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 36)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 37)	AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 38)
Легкая цепь	QSVSSN (SEQ ID NO: 39)	GAS (SEQ ID NO: 40)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 41)

Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи к CD3.

VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 42)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

Таблица 5. Последовательности областей Fc IgG1 и IgG4 человека.

IgG1 человека (UniProt, № P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)
IgG4 человека (UniProt, № P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 45)
IgG1 человека с молчащими мутациями (область Fc)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46)
Человеческий IgG4 с молчащей мутацией (область Fc)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 47)

Таблица 6. Последовательности антитела к CD3

Последовательность константной области легкой цепи к CD3 (легкая каппа-цепь)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 48)
Полноразмерная легкая цепь к CD3 (VL + каппа CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 49)

Последовательность тяжелой цепи к CD3 (VH)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE
(F2B) + Fc IgG1 дт)	WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)
Последовательность тяжелой цепи к CD3 (VH)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE
F2B + подвергнутая сайленсингу Fc IgG1)	WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)
Последовательность тяжелой цепи к CD3 VH F2B (+ Fc IgG4 дт)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE
тяжелой цепи к CD3 VH F2B (+ Fc IgG4 дт)	WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 52)
Последовательность тяжелой цепи к CD3 VH F2B (+ подвергнутая сайленсингу Fc IgG4)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE
тяжелой цепи к CD3 VH F2B (+ подвергнутая сайленсингу Fc IgG4)	WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 53)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (CH1 - шарнир - CH2 - CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 72)
Подвергнутый	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

сайленсингу IgG4 (CH1 - шарнир - CH2 - CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))	GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 73)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 54)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 55)
Полноразмерная тяжелая цепь к CD3 (VH F2B + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 + выступ (S228P, F234A, L235A; T366W)) с C-концевым лизином (K)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 56)
Полноразмерная тяжелая цепь к CD3 (VH F2B + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 + выступ (S228P, F234A, L235A; T366W)) с C-концевым лизином (K)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 75)
Полноразмерная тяжелая цепь к CD3 (VH F2B + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 + впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 57)

Таблица 7. Последовательности антител к ТАА.

Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL VSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 54)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 55)
Двухвалентная тяжелая цепь к ВСМА (TNB-383B wGS1) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K))	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGT LVT VSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGENDGPFDR GOGTLVT VSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGLGK (SEQ ID NO: 58)
Двухвалентная тяжелая цепь к ВСМА (TNB-383B wGS1) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K))	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGT LVT VSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGENDGPFDR GOGTLVT VSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGLG (SEQ ID NO: 76)
Двухвалентная тяжелая цепь к ВСМА (TNB- 383B w GS2) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K))	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGS TYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGEND GPFDRGQGT LVT VSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 59)
Двухвалентная тяжелая цепь к	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV

<p>BCMA (TNB- 383B w GS2) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K))</p>	<p>YYCAKQGENDGPFDRHGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPVWVSGIRGSDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGEND GPFDRHGOGLVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNI YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 77)</p>
<p>одновалентная тяжелая цепь к BCMA (TNB- 383B) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPV WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRHGOGLVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNIHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 60)</p>
<p>одновалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификационн ый номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K))</p>	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGOGLVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNIHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 61)</p>
<p>Одновалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификационн ый номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K))</p>	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGOGLVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNIHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 81)</p>

<p>Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K)</p>	<p>QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQQLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIGSIDYSGYTYN NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSRITVTDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 62)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K)</p>	<p>QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQQLQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIGSIDYSGYTYN NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHKAATADFD YRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSRITVTDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 82)</p>
<p>Одновалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYEYSSGYSLDYRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCP APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSOEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVTDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 63)</p>

<p>Одновалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH2 CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSOEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 83)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP AAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSOEDPEVOFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 64)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4 шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP AAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSOEDPEVOFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 84)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификацион- ный номер клона 346181) x идентификацион- ный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина</p>	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGYY YESSGYSLDYRGOGTLVTVSSESKYGPPCP PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 65)</p>

(S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K))	
Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификационный номер клона 346181 x идентификационный номер клона 345497) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K))	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWYDGSNR YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGYY YESSGYSLDYRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 85)</p>
Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификационный номер клона 345497 x идентификационный номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с С-концевым лизином (K))	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQ LQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CAR HKAATADFDYRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 66)</p>
Двухвалентная тяжелая цепь к PSMA (идентификационный номер клона 345497 x идентификационный номер клона 346181) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K))	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQ LQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CAR HKAATADFDYRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 86)</p>
одновалентная	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLE

<p>тяжелая цепь к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с C-концевым лизином (K)</p>	<p>WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAV  YYCASGVYSFDYRGQGLVTVSSESKYGPPCPCPAPE<sup>AA</sup>GGPSVF  LFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES  NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLGK (SEQ ID NO: 67)</p>
<p>Одновалентная тяжелая цепь к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без C-концевого лизина (K)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLE  WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAV  YYCASGVYSFDYRGQGLVTVSSESKYGPPCPCPAPE<sup>AA</sup>GGPSVF  LFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES  NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLGK (SEQ ID NO: 78)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь GS1 к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с C-концевым лизином (K)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLE  WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAV  YYCASGVYSFDYRGQGLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR  LSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDYVDSVK  GRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASGVYSFDYRGQGLV  TVSSESKYGPPCPCPAPE<sup>AA</sup>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCV  VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  SFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK (SEQ ID NO:  68)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь GS1 к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без C-концевого лизина (K)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLE  WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAV  YYCASGVYSFDYRGQGLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR  LSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDYVDSVK  GRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASGVYSFDYRGQGLV  TVSSESKYGPPCPCPAPE<sup>AA</sup>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCV  VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  SFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK (SEQ ID NO: 79)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь GS2 к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, с C-концевым лизином (K)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLE  WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAV  YYCASGVYSFDYRGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ  PGGSLRLSCAASGFSFDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDY  VDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASGVYSFDYR  GOGTLTVSSESKYGPPCPCPAPE<sup>AA</sup>GGPSVFLFPPKPKDTLMISR  TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV  YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  PVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL  SLSLGK (SEQ ID NO: 69)</p>

Двухвалентная тяжелая цепь GS2 к CD 19 + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, шарнир CH CH3, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, без С-концевого лизина (K)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNACKSLYLQMNLSRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDY VDSVKGRFTISRDNACKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCASGVYSFDYR GOGTLTVSSESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLG (SEQ ID NO: 80)
--	--

В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, имеющую специфичность связывания с BCMA, PSMA или CD19, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, имеющую специфичность связывания с другим белком, например, CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена, и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащую CH2 и/или CH3 и/или домены CH4, в отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающего домена, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, в одновалентной или двухвалентной конфигурации. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь / легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белок CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении BCMA, PSMA, или CD19, в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитело по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении BCMA человека, PSMA человека, или CD19 человека в то время как другое плечо может быть специфичным в отношении клеток-мишеней, опухлеассоциированных антигенов, нацеливающих антигенов, например, интегринов и т.д., антигенов патогенов, белков контрольных точек и т.п. Клетки-мишени, в частности, включают раковые клетки, включая, без ограничения, клетки солидных опухолей, например, опухолей

предстательной железы, как обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении ВСМА человека, PSMA человека, или CD19 человека, тогда как другое плечо является специфичным в отношении CD3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи к CD3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 43, связанную с последовательностью SEQ ID NO: 48, полипептид тяжелой цепи к CD3, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 56 или 57, и полипептид тяжелой цепи к ВСМА, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 58, 59 или 60. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 58, 59 или 60. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 58. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 58. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 59. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 59. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 60. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи к CD3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 43, связанную с последовательностью SEQ ID NO: 48, полипептид тяжелой цепи к CD3, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 56 или 57, и



предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи к CD3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 43, связанную с последовательностью SEQ ID NO: 48, полипептид тяжелой цепи к CD3, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 56 или 57, и полипептид тяжелой цепи к CD19, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 67, 68 или 69. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 67. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 67. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 68. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 68. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 49, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 56, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 69. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 49, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 56, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 69.

В объем изобретения входят различные форматы полиспецифических антител, включая, без ограничения, одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и их кратные им полипептиды. Полиспецифические антитела в данном документе конкретно включают полиспецифические (например, биспецифические) антитела к Т-клеткам, связывающиеся с BCMA, PSMA или 19 и CD3 (антитела к BCMAxCD3, антитела к PSMAxCD3, антитела к PSMAxCD3, антитела к CD19xCD3) и которые содержат вариант домена Fc IgG4 человека, содержащий первую последовательность константной области тяжелой цепи,

содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ), и вторую последовательность константной области тяжелой цепи, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина). Этот вариант или модифицированный домен Fc IgG4 предотвращает нежелательный обмен Fab, снижает эффекторную функцию антитела, а также способствует гетеродимеризации полипептидных субъединиц тяжелой цепи с образованием биспецифического антитела. Такие антитела индуцируют сильное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих ВСМА, PSMA или CD19, соответственно.

#### Получение антител

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, в данном случае продуцируются трансгенными животными, включая трансгенных мышей и крыс, предпочтительно крыс, у которых эндогенные гены иммуноглобулина нокаутированы или отключены. В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, описанные в данном документе, продуцируются в UniRat™. У UniRat™ гены эндогенного иммуноглобулина подвергнуты сайленсингу, и используется транслокус тяжелой цепи иммуноглобулина человека для экспрессии разнообразного, оптимизированного естественным образом репертуара полностью человеческих HCAb. В то время как эндогенные локусы иммуноглобулина у крыс могут быть нокаутированы или подвергнуты сайленсингу с использованием различных технологий, в UniRat™ для инактивации эндогенного J-локуса тяжелой цепи крысы, локуса СК легкой цепи и локуса Сл легкой цепи была использована технология с использованием (эндо)нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZNF). Конструкции ZNF для микроинъекций в ооциты могут продуцировать нокаутные (KO) по IgH и IgL линии. Подробнее см., например, Geurts et al., 2009, Science 325:433. Characterization of Ig heavy chain knockout rats has been reported by Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Преимущества технологии ZNF заключаются в том, что негомологичное соединение концов для сайленсинга гена или локуса посредством делеций до нескольких т.п.н. также может обеспечивать сайт-мишень для гомологичной интеграции (Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64–67). Человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые в UniRat™, называются UniAb™ и могут связывать эпитопы, которые нельзя атаковать с помощью обычных антител. Их высокая специфичность, аффинность и небольшой размер делают их идеальными для моно- и полиспецифических применений.

В дополнение к UniAb™ в частности, в данный документ включены антитела, содержащие только тяжелые цепи, лишенные верблужьего каркаса и мутаций VHH, и их функциональные области VH. Такие антитела, содержащие только тяжелые цепи, могут, например, быть продуцированы у трансгенных крыс или мышей, которые содержат локусы генов, полностью состоящих только из тяжелых цепей человека, как описано, например, в WO2006/008548, но и у других трансгенных млекопитающих, таких как кролик, морская свинка, также можно использовать крыс, причем предпочтительны крысы и мыши. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, включая их функциональные фрагменты VHH или VH, также могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК путем экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в подходящем эукариотическом или прокариотическом хозяине, включая, например, клетки млекопитающих (например, клетки CHO), *E. coli* или дрожжи.

Домены антител, содержащих только тяжелые цепи, сочетают в себе преимущества антител и низкомолекулярные лекарственные средства: могут быть одновалентными или мновалентными; обладают низкой токсичностью; и экономически эффективны в производстве. Из-за их небольшого размера эти домены просты в применении, включая пероральное или местное введение, характеризуются высокой стабильностью, включая стабильность в желудочно-кишечном тракте; и их период полужизни может быть адаптирован к желаемому применению или показаниям. Кроме того, домены VH и VHH HCAb могут быть получены экономически эффективным способом.

В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, согласно настоящему изобретению, включая UniAb™, имеют нативный аминокислотный остаток в первом положении области FR4 (аминокислотное положение 101 согласно системе нумерации Kabat), замещенный другим аминокислотным остатком который способен разрушать экспонированный на поверхности гидрофобный участок, содержащий или связанный с нативным аминокислотным остатком в этом положении. Такие гидрофобные участки, как правило, скрыты на поверхности взаимодействия с константной областью легкой цепи антитела, но становятся доступными на поверхности в HCAb и, по меньшей мере частично, служат для нежелательной агрегации и ассоциации легкой цепи HCAb. Замещенный аминокислотный остаток предпочтительно является заряженным и более предпочтительно положительно заряженным, например, лизином (Lys, K), аргинином (Arg, R) или гистидином (His, H), предпочтительно аргинином (R). В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, полученные от трансгенных животных, содержат мутацию Tgr в Arg в положении 101. Получаемые в результате HCAb предпочтительно обладают высокой аффинностью

связывания с антигеном и растворимостью в физиологических условиях в отсутствие агрегации.

В рамках настоящего изобретения были идентифицированы человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, с уникальными последовательностями от животных UniRat™ (UniAb™), которые связываются с CD3, BCMA, PSMA, или CD 19 человека в анализах белков и связывания клеток на основе ИФА. Идентифицированные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) (см., например, таблицы 1 и 2) являются положительными в отношении связывания белка и/или связывания с клетками, экспрессирующими белок-мишень (например, CD3, BCMA, PSMA или CD 19), и все они являются отрицательными в отношении связывания с клетками, которые не экспрессируют белок-мишень.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами на белке-мишени, например, UniAb™ можно идентифицировать с помощью анализов конкурентного связывания, таких как иммуноферментные анализы (ИФА) или анализы конкурентного связывания на основе проточной цитометрии. Например, можно использовать конкуренцию между известными антителами, связывающимися с антигеном-мишенью, и представляющим интерес антителом. Используя этот подход, можно разделить набор антител на те, которые конкурируют с эталонным антителом, и те, которые не конкурируют. Неконкурирующие антитела идентифицируются как связывающиеся с отдельным эпитопом, который не перекрывается с эпитопом, связанным эталонным антителом. Часто одно антитело иммобилизуют, антиген связывается, а второе, меченое (например, биотинилированное) антитело тестируют в анализе на основе ИФА на способность связывать захваченный антиген. Это также можно сделать с помощью платформ для поверхностного плазмонного резонанса (ППР), включая ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 и Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) и системе визуализации для ППР MX96 (Ibis technologies BV), а также на других платформах для биослойной интерферометрии, таких как Octet Red384 и Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Для получения дополнительных сведений см. Примеры в данном документе.

Как правило, антитело «конкурирует» с эталонным антителом, если оно вызывает примерно 15-100% снижение связывания эталонного антитела с антигеном-мишенью, как определено стандартными методами, например, с помощью анализов конкурентного связывания, описанных выше. В различных вариантах осуществления относительное ингибирование составляет по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по

меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или выше.

#### Фармацевтические композиции, применение и способы лечения

Другим аспектом настоящего изобретения является обеспечение фармацевтических композиций, содержащих одно или более полиспецифических связывающих соединений по настоящему изобретению в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в данном документе, например, но не ограничиваются ими, адъюванты, твердые носители, вода, буферы или другие носители, используемые в данной области для хранения терапевтических компонентов или их комбинаций.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAb™), которое связывается с белком-мишенью (например, CD3, BCMA, PSMA или CD19). В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое) антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAb™) со специфичностью связывания в отношении двух или более неперекрывающихся эпитопов на белке-мишени (например, CD3, BCMA, PSMA или CD 19). В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое) антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAb™) со специфичностью связывания с белком-мишенью (например, BCMA, PSMA, или CD19) и со специфичностью связывания с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью связывания на Т-клетке, такой как, например, белок CD3 на Т-клетке).

Фармацевтические композиции антител, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, готовят для хранения путем смешивания белков, имеющих желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), например, в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как

хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно стерильны и по существу изотоничны и произведены согласно условиям правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (например, дозировка для единичного введения). Состав зависит от выбранного пути введения. Антитела, описанные в данном документе, могут вводиться посредством внутривенной инъекции или инфузии, или подкожно. Для инъекционного введения, антитела, описанные в данном документе, могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически-совместимых буферах для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать носители, эксципиенты или стабилизаторы как описано выше. В качестве альтернативы, антитела могут быть лиофилизированы для смешивания с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед использованием.

Составы антител описаны, например, в патенте США № 9034324. Подобные составы могут быть использованы для антител, содержащих только тяжелые цепи, включая UniAbs™, по настоящему изобретению. Составы антител для подкожного введения описаны, например, в патентах US20160355591 и US20160166689.

#### Способы применения

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, полиспецифические антитела и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний и патологических состояний, характеризующихся экспрессией белка-мишени (например, CD3, BCMA, PSMA, или CD19), включая, без ограничения, патологические состояния и заболевания, описанные далее в данном документе.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции, содержащие антитела к ВСМА, можно использовать для лечения заболеваний, связанных с В-клетками, включая злокачественные В-клеточные и плазмоклеточные новообразования и аутоиммунные нарушения, характеризующиеся экспрессией или сверхэкспрессией ВСМА.

В-клеточные нарушения включают злокачественные В-клеточные и плазмоклеточные новообразования и аутоиммунные нарушения, включая, без ограничения, плазмцитому, лимфому Ходжкина, фолликулярные лимфомы, мелкоклеточные лимфомы с нерассеченными ядрами, эндемическую лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта, лимфому из клеток маргинальной зоны, внеузловую лимфому лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистыми оболочками, узловую моноцитонидную В-клеточную лимфому, лимфому селезенки, мантийноклеточную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную смешанно-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, В-клеточную легочную ангиоцентрическую лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточные пролиферации с неясным злокачественным потенциалом, лимфоматоидный гранулематоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, иммунорегуляторное нарушение, ревматоидный артрит, миастению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, пузырьчатку обыкновенную, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию и быстро прогрессирующий гломерулонефрит, болезнь тяжелых цепей, первичный или иммуноцит-ассоциированный амилоидоз или моноклональную гаммапатию.

Плазмоклеточные нарушения, характеризующиеся экспрессией ВСМА, включают множественную миелому (ММ). ММ представляет собой В-клеточное злокачественное образование, характеризующееся моноклональным расширением и накоплением аномальных плазматических клеток в компартменте костного мозга. Современные способы лечения ММ часто вызывают ремиссии, но почти все пациенты в конечном итоге рецидивируют и умирают. Существуют убедительные доказательства иммуноопосредованной элиминации клеток миеломы в условиях трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; однако токсичность данного подхода высока, и лишь немногие пациенты излечиваются. Хотя некоторые моноклональные антитела продемонстрировали перспективность лечения ММ в доклинических

исследованиях и ранних клинических испытаниях, последовательная клиническая эффективность любой терапии моноклональными антителами для ММ не была убедительно продемонстрирована. Поэтому существует большая потребность в новых методах лечения, включая иммунотерапию ММ (см., например, Carpenter et al., Clin Cancer Res 2013, 19(8):2048-2060).

Сверхэкспрессия или активация ВСМА его лигандом, индуцирующим пролиферацию, APRIL, как известно, стимулирует прогрессию множественной миеломы человека (ММ) *in vivo*. Также было показано, что ВСМА стимулирует *in vivo* рост клеток ММ несущих p53 мутацию у мышей с ксенотрансплантированными клетками ММ. Поскольку активность пути APRIL/ВСМА играет ключевую роль в патогенезе ММ и устойчивости к лекарственным средствам посредством двунаправленного взаимодействия между клетками и поддерживающего их микроокружения, ВСМА идентифицирован в качестве мишени для лечения ММ. Для дополнительных деталей, см., Yu-Tsu Tai et al., Blood 2016; 127(25):3225-3236.

Другим В-клеточным нарушением с вовлечением плазматических клеток, т.е. экспрессирующих ВСМА, является системная красная волчанка (СКВ), также известная как волчанка. СКВ представляет собой системное аутоиммунное заболевание, которое может поражать любую часть тела и проявляется иммунной системой, поражающей собственные клетки и ткани организма, что приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей. Это реакция гиперчувствительности типа III, при которой антитело-иммунные комплексы преципитируют и вызывают дальнейший иммунный ответ (Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337).

Антитела к ВСМА, содержащие только тяжелые цепи (UniAb) по настоящему изобретению можно использовать для разработки терапевтических средств для лечения ММ, СКВ и других В-клеточных или плазмоклеточных нарушений, характеризующихся экспрессией ВСМА, таких как перечисленные выше. В частности, антитела к ВСМА, содержащие только тяжелые цепи, (UniAb) по настоящему изобретению являются кандидатами для лечения ММ, отдельно или в комбинации с другими способами лечения ММ.

PSMA представляет собой трансмембранный белок типа II, который экспрессируется в ткани эпителия предстательной железы и его экспрессия усиливается при раке предстательной железы и в новой сосудистой сети солидных опухолей. Он также экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях, таких как мозг, почки и слюнные железы, но его избыточная экспрессия в злокачественной ткани предстательной железы делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения

злокачественного новообразования предстательной железы. Он также может быть актуален для терапии или визуализации солидных опухолей, учитывая его высокую экспрессию в злокачественных новообразованных сосудах. Моноклональные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство и Т-клетки с химерным антигенным рецептором, нацеленные на PSMA, были описаны в контексте лечения метастатического рака предстательной железы (Hernandez-Hoyos et al . 2016, PMID: 27406985, DiPippo et al., 2014, PMID: 25327986, Serganova et al., 2016, PMID: 28345023). Кроме того, радионуклидные конъюгаты, специфичные для PSMA, исследуют в отношении визуализации и лечения рака предстательной железы (например, Hofman et al., 2018 PMID: 29752180).

В одном аспекте антитела к PSMA, содержащие только тяжелые цепи, (например, UniAb™) и фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией PSMA, включая, помимо прочего, рак предстательной железы и солидные опухоли.

CD19 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который экспрессируется на всех В-клетках человека, но не обнаруживается на плазматических клетках. Он имеет относительно большой цитоплазматический хвост из 240 аминокислот. Внеклеточные Ig-подобные домены разделены потенциально дисульфид-связанным не-Ig-подобным доменом и сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазматический хвост содержит по меньшей мере девять остатков тирозина возле C-конца, некоторые из которых, как было показано, фосфорилированы. Наряду с CD20 и CD22 ограниченная экспрессия CD19 в линии В-клеток делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Из-за его наблюдаемой экспрессии при ряде гематологических злокачественных новообразований CD19 является многообещающей мишенью для терапевтических средств на основе антител.

В одном аспекте антитела к CD19, содержащие только тяжелые цепи, (например, UniAb™) и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения гематологических злокачественных опухолей, характеризующихся экспрессией CD19, включая, без ограничения, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДККЛ), неходжкинскую лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

Диффузная крупноклеточная В-лимфома (ДККЛ или ДВКЛ) является наиболее распространенной формой неходжкинской лимфомы среди взрослых (Blood 1997 89 (11):

3909-18), с предполагаемой ежегодной заболеваемостью 7-8 случаев на 100000 человек в год в США и Великобритании. Она характеризуется как агрессивное злокачественное новообразование, которое может возникнуть практически в любой части тела. Причины ДККЛ не совсем понятны, и она может возникать из нормальных В-клеток, а также злокачественной трансформации других типов лимфомных или лейкозных клеток. Подходы к лечению, как правило, включают химиотерапию и лучевую терапию, и в результате общая пятилетняя выживаемость у взрослых составляет около 58%. Хотя некоторые моноклональные антитела оказались многообещающими для лечения ДККЛ, последовательная клиническая эффективность еще не была окончательно продемонстрирована. Следовательно, существует большая потребность в новых видах терапии, включая иммунотерапию, для ДККЛ.

В другом аспекте антитела к CD19, содержащие только тяжелые цепи, (например, UniAb™) и фармацевтические композиции согласно данному изобретению могут быть использованы для лечения аутоиммунных нарушений, характеризующихся вызываемыми заболеванием В-клетками, которые экспрессируют CD19, включая, без ограничения, системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА) и рассеянный склероз (РС).

Эффективные дозы композиций согласно данному изобретению для лечения заболевания варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, место назначения, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но млекопитающие, отличные от человека, также могут поддаваться лечению, например, домашние животные, такие как собаки, кошки, лошади и т.д., лабораторные млекопитающие, такие как кролики, мыши, крысы и т.д., и тому подобное. Для оптимизации безопасности и эффективности можно подбирать лекарственные дозировки.

Уровни дозировки могут быть легко определены обычным квалифицированным врачом и могут быть изменены при необходимости, например, при необходимости изменения ответа субъекта на терапию. Количество действующего вещества, которое можно комбинировать с материалами носителя для получения единичной лекарственной формы, варьируется в зависимости от хозяина, который поддается лечению, и конкретного способа введения. Стандартные лекарственные формы обычно содержат от около 1 мг до около 500 мг действующего вещества.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая дозировка агента может составлять от около 0,0001 до 100 мг/кг и более, обычно от 0,01 до 5 мг/кг от массы тела

хозяина. Например, дозировка может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Иллюстративный режим лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3–6 месяцев. Терапевтические вещества по настоящему изобретению обычно вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня терапевтического вещества в крови пациента. Альтернативно, терапевтические вещества по настоящему изобретению можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни полипептида у пациента.

Как правило, композиции готовят в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов, либо суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Описанные в данном документе фармацевтические композиции подходят для внутривенного или подкожного введения, непосредственно или после восстановления твердых (например, лиофилизированных) композиций. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополимер, для усиления адьювантного эффекта, как описано выше. Langer, *Science* 249: 1527, 1990 и Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119, 1997. Агенты согласно данному изобретению можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить длительное или пульсирующее высвобождение действующего вещества. Фармацевтические композиции, как правило, составлены как стерильные, практически изотонические и полностью соответствующие всем нормам Правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

Токсичность антител и структур антител, описанных в данном документе, может быть определена стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, путем определения LD<sub>50</sub> (доза, летальная для 50% популяции) или LD<sub>100</sub> (доза, летальная для 100% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектом является терапевтическим показателем. Данные, полученные из этих анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при составлении диапазона доз, который не токсичен для применения у людей. Дозировка антител, описанных в данном документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций,

которые включают эффективную дозу с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах данного диапазона в зависимости от используемой дозы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбраны индивидуально врачом с учетом состояния пациента.

Композиции для введения, как правило, включают антитело или другой агент (например, другой абляционный агент), растворенный в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно в водном носителе. Могут быть использованы различные водные носители, например, забуференный солевой раствор и тому подобное. Данные растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие рН агенты и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты и тому подобное, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобное. Концентрация активного агента в данных составах может варьироваться в широких пределах и будет выбираться в основном на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и тому подобного в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента (например, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) и Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

Также в объем изобретения входят наборы, содержащие активные агенты и их составы, изобретения и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный компонент, например, химиотерапевтический препарат и др. Наборы, как правило, включают этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Используемый в данном документе термин «этикетка» включает любые письменные или записанные материалы, поставляемые в наборе или вместе с ним, или иным образом сопровождающие набор.

Теперь, когда изобретение полностью описано, для специалиста в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от сущности или объема изобретения.

#### Примеры

##### Пример 1. Образование гетеродимера

Образование гетеродимеров анализировали с помощью анализов методом ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, чтобы

определить, могут ли антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения, содержащие различные мутации в их шарнирах и областях Fc, а также мутации типа «выступы-во-впадины», успешно экспрессироваться и собираться в желаемые комбинации гетеродимеров. Для проверки этого конструкторы антител были экспрессированы в культурах рекомбинантных клеток CHO. Затем собранную культуральную жидкость очищали с помощью аффинной хроматографии на основе белка А для анализа различных полученных фрагментов антител. Затем элюированные из колонки с белком А пулы анализировали на гелях в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для визуализации различных молекул.

Результаты этих анализов показаны на фиг. 2, панелях А и В, на фиг. 3, панелях А и В, и на фиг. 24, и демонстрируют, что процент образования гетеродимеров для молекул антител, которые включают мутации типа «выступы-во-впадины», выше, даже когда мутации, подавляющие эффекторную функцию (F234A, L235A), и мутации, предотвращающие обмен плечами Fab (S228P), также присутствуют в последовательностях тяжелых цепей. Как показано на фиг. 25, очищенные конструкции CD 19 были проанализированы на предмет процентного содержания высокомолекулярных (HMB) и низкомолекулярных (LMB) молекул, а также процентного содержания мономеров.

Пример 2. Связывание Fc-гамма-рецептора с помощью биослойной интерферометрии (BLI)

Взаимодействия Fc-гамма-рецептор-IgG анализировали на платформе Octet с использованием биосенсора Ni-NTA (ForteBio). Биосенсоры Ni-NTA имеют Tris-NTA QIAGEN, заряженный никелем (Ni<sup>2+</sup>), предварительно иммобилизованный на наконечнике. Ni-NTA будет связываться с HIS-меткой, присоединенной к рекомбинантным белкам. В этом формате белок Fc-гамма-рецептора загружается в биосенсор в качестве лиганда с последующей ассоциацией с IgG. Антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения исследовали для анализа степени взаимодействия между их областями Fc и белками Fc-гамма-рецептора, иммобилизованными на биосенсоре.

В данном документе Fc-гамма-рецептор представлял собой человеческий Fc-гамма-рецептор I/CD64 (Aero Biosystems). Тестируемые концентрации антител включали двукратное серийное разведение от 100 нМ до 1,6 нМ. Результаты этих исследований показаны на фиг. 4, панелях А-D, фиг. 5, панелях А-E, фиг. 6, панелях А-D, фиг. 7, панелях А-E, и фиг. 26, панелях А-D, и демонстрируют, что связывание антител с подвергнутым сайленсингу Fc-рецептором с человеческим Fc-гамма-R1 значительно

подавляется, даже когда в области Fc также присутствуют мутации типа «выступ-вопядины» и мутации обмена плечами Fab.

В частности, на фиг. 4, панели А, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG1 к CD3 x BCMA, которое не содержит мутаций KiH или молчащих мутаций. Данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре. На фиг. 4, панели В, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели А, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижено из-за наличия молчащих мутаций. На фиг. 4, панели С показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG1 к CD3 x BCMA, которое содержит мутации KiH, но не содержит молчащие мутации. Эти данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, способом, который очень похож на то, что наблюдалось с антителом на панели А. На фиг. 4, панели D, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели С, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда включены мутации KiH.

На фиг. 5, панели А, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x BCMA, которое не содержит мутаций KiH или молчащих мутаций, но включает мутацию S228P для предотвращения обмена плеч Fab. Данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре. На фиг. 5, панели В, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели А, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A). Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда присутствует мутация S228P. На фиг. 5, панели С показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x BCMA, которое содержит мутации KiH и мутацию S228P, но не содержит молчащие мутации. Эти данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, способом, который очень похож на то, что наблюдалось с антителом на панели А. На фиг. 5, панели D показаны результаты для того же биспецифического антитела, которое использовалось в панели С, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A) в дополнение к мутациям S228P и KiH. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-

гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда включены мутации S228P и KiH. На панели E показаны результаты для биспецифического (двухвалентного) антитела IgG4 к CD3 x BCMA, которое содержит мутацию S228P, молчащие мутации F234A и L235A, а также мутации KiH в домене CH3. Эти данные демонстрируют, что взаимодействие между этим антителом и Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, было значительно снижено даже при наличии мутаций S228P и KiH.

На фиг. 6, панели A, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG1 к CD3 x PSMA, которое не содержит мутаций KiH или молчащих мутаций. Данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре. На фиг. 6, панели B, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели A, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижено из-за наличия молчащих мутаций. На фиг. 6, панели C показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG1 к CD3 x PSMA, которое содержит мутации KiH, но не содержит молчащие мутации. Эти данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, способом, который очень похож на то, что наблюдалось с антителом на панели A. На фиг. 6, панели D, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели C, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда включены мутации KiH.

На фиг. 7, панели A, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x PSMA, которое не содержит мутаций KiH или молчащих мутаций, но включает мутацию S228P для предотвращения обмена плеч Fab. Данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре. На фиг. 7, панели B, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели A, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A). Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда присутствует мутация S228P. На фиг. 7, панели C показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x PSMA, которое содержит мутации KiH и мутацию S228P, но не содержит молчащие мутации. Эти данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-

гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, способом, который очень похож на то, что наблюдалось с антителом на панели А. На фиг. 7, панели D показаны результаты для того же биспецифического антитела, которое использовалось в панели С, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A) в дополнение к мутациям S228P и KiH. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда включены мутации S228P и KiH. На панели E показаны результаты для биспецифического (двухвалентного) антитела IgG4 к CD3 x PSMA, которое содержит мутацию S228P, молчащие мутации F234A и L235A, а также мутации KiH в домене CH3. Эти данные демонстрируют, что взаимодействие между этим антителом и Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, было значительно снижено даже при наличии мутаций S228P и KiH.

На фиг. 26, панели А, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x CD19, которое не содержит мутаций KiH или молчащих мутаций, но включает мутацию S228P для предотвращения обмена плеч Fab. Данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре. На фиг. 26, панели В, показаны результаты для того же биспецифического антитела, что и на панели А, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A). Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда присутствует мутация S228P. На фиг. 26, панели С, показаны результаты для биспецифического (одновалентного) антитела IgG4 к CD3 x CD19, которое содержит мутации KiH и мутацию S228P, но не содержит молчащие мутации. Эти данные демонстрируют, что антитело взаимодействует с Fc-гамма-рецептором, иммобилизованным на биосенсоре, способом, который очень похож на то, что наблюдалось с антителом на панели А. На фиг. 26, панели D, показаны результаты для того же биспецифического антитела, которое использовалось в панели С, но теперь содержит молчащие мутации в домене CH2 (F234A, L235A) в дополнение к мутациям S228P и KiH. Эти результаты демонстрируют, что взаимодействие между антителом и Fc-гамма-рецептором на биосенсоре значительно снижается из-за присутствия молчащих мутаций, даже когда включены мутации S228P и KiH.

В целом, данные, представленные на фиг. 4, 5, 6, 7 и 26 демонстрируют, что последовательность области VH биспецифического антитела не влияет на функциональные свойства описанных в данном документе мутаций Fc IgG4. Таким образом, описанные в данном документе модификации Fc IgG4 (S228P; F234A, L235A;

T366W, T366S, L368A и Y407V) могут быть реализованы в антителах, имеющих различные последовательности VH (т.е. различные мишени связывания) для достижения снижения обмена плеч Fab (S228P), снижения активности эффекторных функций (F234A, L235A) и надлежащей гетеродимеризации (T366W; T366S, L368A и Y407V).

Пример 3. Анализ методом проточной цитометрии связывания с положительными и отрицательными по PSMA клетками UniAbs™ к PSMA

Связывание с положительными по PSMA клетками оценивали с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore) с использованием линии клеток LNCaP (ATCC: CRL-1740), линии клеток 22Rv1 (ATCC CRL-2505), линии клеток PC3 (ATCC CRL-1435), стабильно трансфицированной для экспрессии PSMA человека, или линии клеток DU-145 (ATCC HTB-81). Вкратце, 50000 клеток-мишеней окрашивали серией разведений очищенных UniAb™ в течение 30 минут при 4°C. После инкубации клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии (IX PBS, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub>) и окрашивали козым F(ab')<sub>2</sub> против IgG человека, конъюгированным с R-фикоэритрином (PE) (Southern Biotech, кат. № 2042-09) для обнаружения связанных с клеткой антител. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии и измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) с помощью проточной цитометрии. СИФ клеток, окрашенных только вторичным антителом, использовали для определения фонового сигнала, а связывание каждого антитела преобразовывали в значение кратности превышения фонового сигнала. Связывание с положительными по PSMA яванского макака определяли с использованием того же протокола со следующими модификациями: клетки-мишени были получены из клеток Freestyle 293-F (ThermoFisher R79007), транзientно трансфицированных для экспрессии внеклеточного домена PSMA яванского макака. В некоторых экспериментах значения EC50 рассчитывали с помощью GraphPad Prism 7.

В таблице 8 приведена активность связывания с мишенью нескольких антител, содержащих только тяжелые цепи, к PSMA (HCAb), описанных в данном документе. В столбце 1 показан идентификационный номер клона HCAb. В столбце 2 показано связывание с клетками LNCaP, измеренное в виде кратности превышения фонового сигнала СИФ.

Таблица 8. Связывание с линией клеток, экспрессирующих PSMA

Колонка 1: Идент. номер клона	Колонка 2: LNCaP
325920	282
346181	264
346165	243
346172	216

326109	25
325867	210
325742	200
325748	193
325940	169
325836	163
326027	138
326087	129
326084	125
326028	117
345497	112
326029	109
345461	102
345493	101
345436	87
345443	84
345490	80
345482	80
345485	71
345463	68
325932	64
345505	59
345508	55
345480	47
326116	38
345509	37
345444	23
345421	22
345447	14
345510	13
345438	13

Различия в связывании с PSMA яванского макака, как показано на фиг. 8, панели А и В, подтверждает различие в эпитопе PSMA человека, распознаваемую HCAb 346181 и 345497.

#### Пример 4. Композиция бипаратопных и двухвалентных антител к PSMA

Как показано в таблице 9, клон к PSMA с идентификационным номером 350123 состоит из последовательности клона с идентификационным номером 346181, связанной с последовательностью клона ID 345497 через мостиковую последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 71). Клон с идентификационным номером 350122 состоит из двух повторов клона с идентификационным номером 346181, соединенных одной и той же линкерной последовательностью. Клон с идентификационным номером 350123 является бипаратопным, поскольку он состоит из двух доменов к PSMA, распознающих разные эпитопы на PSMA. Клон с идентификационным номером 350122 является двухвалентным, но не бипаратопным, поскольку он состоит из одного и того же домена к PSMA в тандеме. Схематические иллюстрации различных трехцепочечных антителоподобных молекул (ТСА) представлены на фиг. 1, панелях А-С.

Таблица 9. Описание аминокислотной последовательности бипаратопных и двухвалентных антител к PSMA

Идентификационный номер клона	Последовательность 1	Линкерная последовательность	Последовательность 2
350123	346181	GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 71)	345497
350122	346181	GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 71)	346181

Пример 5. Опосредованное полиспецифическим антителом уничтожение PSMA-положительных клеток опухоли предстательной железы посредством перенаправления Т-клеток

Анализы с использованием покоящихся Т-клеток

Клетки-мишени высевали из расчета 15000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение ночи при 37°C. После инкубации увеличивающиеся количества полиспецифического антитела добавляли вместе с покоящимися Т-клетками человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1 и инкубировали в течение дополнительных 48 или 72 часов при 37°C (48 часов для анализов с клетками LNCaP, MDA-PCa-2b и PC3-PSMA и 72 часа для анализов с клетками 22Rv1). Гибель клеток измеряли с использованием реагента для пролиферации клеток WST-1 (Sigma кат. №: 11644807001) или при помощи проточной цитометрии. В некоторых экспериментах небольшой образец каждого супернатанта собирали после инкубации, но до анализа жизнеспособности клеток-мишеней, и сохраняли для анализа продукции цитокинов. Когда жизнеспособность клеток анализировали с помощью реагента WST-1, исходный реагент добавляли в каждую лунку в разведении 1:10 и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Затем измеряли оптическую плотность при 450 нм (эталонная длина волны 690 нм) и рассчитывали процент специфического лизиса

Если жизнеспособность клеток-мишеней анализировали с помощью проточной цитометрии, то клетки-мишени метили перед началом анализа мембранным красителем DiR (ThermoFisher D12731). После инкубации с Т-клетками и антителами супернатанты либо сохраняли для анализа цитокинов, либо утилизировали. Затем лунки промывали один раз для сбора мертвых клеток опухоли и Т-клеток, которые переносили в планшет для проточной цитометрии. Оставшиеся прикрепленные клетки опухоли обрабатывали трипсином и затем добавляли в соответствующие лунки планшета для проточной цитометрии. Реагент аннексин-V использовали для окрашивания мертвых клеток, и проводили проточную цитометрию (BD FACSCelesta) для количественного определения процента мертвых опухолевых клеток в каждом образце, гейтируемых по окрашиванию DiR. Лунки, содержащие необработанные клетки-мишени, использовали для

нормализации спонтанной гибели клеток. В некоторых экспериментах использовали антитело отрицательного контроля, состоящее из того же нацеленного на CD3 плеча, что и в полиспецифических молекулах к PSMAxCD3, но заменой нацеленного на опухоль плеча на VH, специфичную к белку gp120 ВИЧ.

На фиг. 9 показан опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток с использованием нестимулированных Т-клеток. Нестимулированные человеческие Т-клетки инкубировали с клетками, экспрессирующими PSMA (LNCaP), и различными концентрациями полиспецифических антител. Бипаратопное антитело к PSMAxCD3 (350123xCD3) превзошло монопаратопное антитело к PSMAxCD3 (346181xCD3).

Анализы с использованием предварительно активированных Т-клеток

Пан-Т-клетки человека предварительно активировали связанными с планшетом ОКТ3 и IL-2 в течение трех дней с последующим дополнительным днем инкубации со свежим IL-2. Клетки-мишени трипсинизировали, загружали кальцеином-AM (ThermoFisher C3100MP), смешивали с активированными Т-клетками до соотношения Е:Т 20:1 и добавляли в лунки 96-луночного планшета. Добавляли серии разведений различных полиспецифических антител с последующей инкубацией в течение 4 часов при 37°C. Затем супернатанты переносили в черные 96-луночные планшеты и измеряли оптическую плотность при 480 нм / 520 нм возбуждения/испускания для количественного определения высвобождения кальцеина. Клетки-мишени, инкубированные без Т-клеток, использовали для нормализации спонтанного высвобождения кальцеина интактными клетками опухоли. Добавление 2% Тритона-Х в контрольные лунки, содержащие клетки-мишени, позволило рассчитать сигнал кальцеина, соответствующий максимальному лизису клеток. Используя это значение, каждая экспериментальная лунка была представлена в виде процента максимального лизиса клеток. Анализ данных проводили с использованием GraphPad Prism 7.

На фиг. 10 показан опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток с использованием предварительно активированных Т-клеток. Предварительно активированные Т-клетки человека инкубировали с клетками, экспрессирующими PSMA человека, (LNCaP) и различными концентрациями полиспецифических антител. Гибель опухолевых клеток измеряли по высвобождению кальцеина и нормализовали по спонтанному высвобождению опухолевых клеток в отсутствие Т-клеток. Бипаратопное антитело к PSMAxCD3 (350123xCD3) превзошло оба монопаратопных антитела к PSMAxCD3.

На фиг. 11 показано, что полиспецифические антитела не лизируют PSMA-отрицательные клетки. Предварительно активированные человеческие Т-клетки инкубировали с PSMA-отрицательными клетками рака предстательной железы (DU145) и различными концентрациями полиспецифических антител. Ни одно из протестированных антител не привело к лизису этих клеток.

На фиг. 12 показано связывание полиспецифических антител к PSMA $\times$ CD3 с положительными и отрицательными по PSMA клетками. Полиспецифические антитела к PSMA $\times$ CD3 демонстрируют связывание с PSMA-положительными клетками опухоли предстательной железы (22Rv1), но не связываются с PSMA-отрицательными клетками опухоли предстательной железы (DU145). Бипаратопная молекула (350123) показала самое сильное связывание с клеткой-мишенью.

На фиг. 13 показан опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток. Данные на фиг. 13 демонстрирует, что связывание с PSMA через два разных эпитопа приводит к увеличению гибели клеток по сравнению с двухвалентной, но моноспецифической версией антитела.

Пример 6. Монопаратопное биспецифическое антитело к PSMA $\times$ CD3 индуцирует меньшую продукцию цитокинов, чем бипаратопное полиспецифическое антитело к PSMA $\times$ CD3

Продукцию цитокинов анализировали в анализах цитотоксичности опухоли с покоящимися Т-клетками. Дизайн этих анализов подробно описан в другом месте данного документа. Супернатанты собирали после завершения анализов (после 72 часов инкубации для анализов с использованием клеток 22Rv1, 48 часов для всех других линий клеток). Наборы для ИФА использовали для обнаружения IL-2 (Biolegend 431804) и IFN- $\gamma$  (Biolegend 430104) в соответствии с протоколом производителя. Экспериментальные супернатанты разбавляли перед анализом на основе ИФА так, чтобы уровни цитокинов попадали в линейную часть стандартной кривой, поставляемой с каждым набором. В некоторых случаях цитокины не могли быть обнаружены в экспериментальных лунках, и значения были указаны как меньшие или равные нижнему пределу количественного определения для анализа.

На фиг. 14 (панели А, В, и С) показан опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительных клеток и сравнение с продукцией цитокинов. Полиспецифические антитела к PSMA $\times$ CD3 индуцируют опосредованный Т-клетками лизис PSMA-положительной линии клеток рака предстательной железы LNCaP. Бипаратопная молекула (350123) стимулировала более сильное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с монопаратопной молекулой (346181), но также вызывала выработку более

высоких уровней цитокинов, гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкина 2 (IL-2), как показано на фиг. 14, панелях В и С.

В таблице 10 показан опосредованный Т-клетками лизис и продукция цитокинов против четырех линий PSMA-положительных клеток опухоли предстательной железы. Полиспецифические антитела к PSMA $\times$ CD3 тестировали в анализах цитотоксичности опухолевых клеток *in vitro* с использованием нестимулированных Т-клеток и серии доз антитела против панели из четырех линий PSMA-положительных клеток опухоли. Через 72 часа (22Rv1) или 48 часов (MDA-PCa-2b, LNCAP, PC3-PSMA) рассчитывали процент гибели клеток опухоли и регистрировали с помощью EC50, а также если достигали наивысшего процента уничтожения. Супернатанты из этих экспериментальных лунок собирали и анализировали с помощью ИФА на цитокины, гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ) или интерлейкин-2 (IL-2). Монопаратопная молекула (3461881) индуцировала приблизительно эквивалентные уровни противоопухолевой цитотоксичности в отношении всех четырех тестируемых линий клеток по сравнению с бипаратопной молекулой, но имела более высокие EC50 в отношении продукции цитокинов и в большинстве случаев стимулировала более низкие уровни максимальной продукции цитокинов.

Таблица 10. Т-клеточный лизис и продукция цитокинов против четырех линий PSMA-положительных клеток опухоли предстательной железы.

Линия клеток	Антитело	Связывание клеток EC50 (нМ)	Максимальная цитотоксичность (% лизиса)	Уничтожение, EC50 (нМ)	Макс. IFN $\gamma$ (пг/мл)	Макс. IFN $\gamma$ EC50 (нМ)	Макс. IL-2 (пг/мл)	IL-2 EC50 (нМ)
22Rv1	346181 $\times$ CD3	58	45	52,8	21,150	173,8	$\leq$ НПКО	НД
	350123 $\times$ CD3	3	53	0,42	73,031	380,2	$\leq$ НПКО	НД
MDA-PCa-2b	346181 $\times$ CD3	28	26	23,6	14,309	116,5	524	38,5
	350123 $\times$ CD3	2	29	0,41	12,026	0,90	1111	1,11
LNCAP	346181 $\times$ CD3	17	79	14,6	32,237	63,0	183	575
	350123 $\times$ CD3	2	75	0,84	60,397	3,29	1057	3,73
PC3-PSMA	346181 $\times$ CD3	30	42	3,7	7,340	10,1	1569	4,1
	350123 $\times$ CD3	6	51	0,40	10,136	1,01	3480	1,1

Пример 7. Полиспецифические антитела к PSMA $\times$ CD3 индуцируют пролиферацию Т-клеток

PSMA-положительные опухолевые клетки высевали по 25000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и выращивали в течение ночи при 37°C. Пан-Т-клетки человека, выделенные из покоящихся PBMC (Miltenyi 130-096-535), метили красителем для отслеживания клонов CFSE в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher C34554). Затем в лунки, содержащие опухолевые клетки, добавляли 100000 меченых пан-Т-клеток с последующей серией разведений антител и инкубировали при 37°C, 8% CO<sub>2</sub>. После 5 дней инкубации клетки осторожно перемешивали и переносили в планшет для

проточной цитометрии. Клетки осаждали и супернатант удаляли с последующим окрашиванием анти-CD8, конъюгированным с APC, (Biolegend 301049), и анти-CD4, конъюгированным с PE, (Biolegend 317410), в течение 20 минут на льду. Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии для анализа (BD FACSCelesta). Клетки гейтировали по прямому и боковому рассеянию, а также по экспрессии CD4 или CD8. Процент Т-клеток, которые пролиферировали, на что указывает положительное окрашивание CD4 или CD8 и низкий или отрицательный сигнал CFSE, рассчитывали для всей популяции Т-клеток, а также для субпопуляций CD4 и CD8. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью FlowJo и наносили на график в GraphPad Prism 7.

На фиг. 15, панели А, В, С и D, показано, что полиспецифические антитела к PSMAxCD3 стимулировали пролиферацию Т-клеток в присутствии PSMA-положительных клеток опухоли, и что монопаратопные биспецифические антитела к PSMA предпочтительно активируют CD3 Т-клетки. Полиспецифические антитела инкубировали вместе с клетками опухоли, экспрессирующими PSMA, и Т-клетками, меченными красителем CFSE для отслеживания линии дифференцировки. После 5 дней инкубации пролиферацию Т-клеток и состав пролиферированных Т-клеток (CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>) анализировали с помощью проточной цитометрии. На панелях А и В показана общая пролиферация Т-клеток, тогда как на панелях С и D показано соотношение CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток в лунках с пролиферацией. Пунктирная горизонтальная линия демонстрирует соотношение CD8:CD4 нестимулированных Т-клеток и составляет приблизительно 1:2 (фактическое значение = 0,64). Монопаратопное биспецифическое антитело к PSMAxCD3 (346181) предпочтительно активирует CD8 Т-клетки (соотношение CD8:CD4 после экспансии около 2:1), тогда как бипаратопное полиспецифическое антитело к PSMAxCD3 (350123) в меньшей степени активирует CD8<sup>+</sup> Т-клетки (соотношение CD8:CD4 составляет около 1:1).

Пример 8. Полиспецифическое антитело вызывает подавление роста опухоли предстательной железы в модели ксенотрансплантата

Самцам мышей CIEA-NOG с иммунодефицитом в возрасте 5-6 недель (Taconic) имплантировали 10 миллионов клеток 22Rv1 подкожно в правый нижний бок с последующим добавлением 10 миллионов РВМС человека посредством инъекции в хвостовую вену через день после имплантации опухоли. Животные получали лечение 100 мкг полиспецифического антитела или носителя путем инъекции в хвостовую вену, начиная через один день после имплантации опухоли на 1, 5, 9 и 13 дни. Объем опухоли определяли с помощью штангенциркуля и регистрировали в течение 25 дней.

На фиг. 16 показаны результаты модели ксенотрансплантата опухоли 22Rv1. Бипаратопная молекула к PSMAxCD3 (350123) продемонстрировала ингибирование роста опухоли 22Rv1 в модели ксенотрансплантата опухоли. Для каждой группы лечения тестировали трех мышей, и изменение объема опухоли для каждого животного наносили на график в миллиметрах. Животные получали РВМС на 1 день после имплантации опухоли и получали лечение антителами на 1, 5, 9 и 13 дни. У двух из трех животных, получавших полиспецифические антитела, отмечалось замедление прогрессирования опухоли.

#### Пример 9. Анализ активации Т-клеток

CD69 представляет собой маркер клеточной поверхности Т-клеток, экспрессия которого повышается при стимуляции, тем самым выполняя роль индикатора активации Т-клеток. В этом эксперименте активацию CD69 оценивали при 3 различных условиях: 1) общие мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) без покрытия ВСМА; 2) пан-Т-клетки с покрытием ВСМА; и 3) пан-Т-клетки без покрытия ВСМА. РВМС выделяли из лейкоцитной пленки помощью Ficoll (плотность 1,077 г/мл), а криоконсервированные РВМС оттаивали и выдерживали в течение 24 часов при  $2 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI1640 с добавлением 10% FBS при 37°C. На 2-й день пан-Т-клетки выделяли из покоящихся РВМС с использованием набора для отрицательной селекции Miltenyi, и выделенные клетки использовали во 2-м и 3-м вариантах условий анализа. Для первого варианта условий анализа РВМС подсчитывали и помещали в планшеты для анализа.

Для клеток, которые оценивали в условиях с покрытием антигеном, 96-луночные планшеты покрывали рекомбинантным белком ВСМА в концентрации 1 мкг/мл (белок ВСМА человека, Fc-метка, Aero Biosystems, кат. № BC7-H5254), рекомбинантным белком PSMA в концентрации 1 мкг/мл (рекомбинантный человеческий белок PSMA/FOLH1, от RND Systems, кат. № 4234-ZN-0101) или рекомбинантным белком CD19 в концентрации 10 мкг/мл (человеческий белок CD19, His-метка, Aero Biosystems, кат. № CD9-H52H2). Биспецифические антитела анализировали с использованием 12-точечной кривой дозовой зависимости с 3-кратными разведениями, максимальная доза составляла 300 нМ. Биспецифические антитела и Т-клетки ресуспендировали в RPMI1640 с добавлением 10% FBS и инкубировали в течение 18 часов. Пан-Т-клетки были эффекторными клетками и высевались в количестве 100 тыс. клеток/лунка.

Для клеток, которые оценивали в условиях без покрытия антигеном, биспецифические антитела инкубировали с клетками, используя 12-точечную кривую дозовой зависимости с 3-кратными разведениями. 300 нМ биспецифического антитела

были самой высокой протестированной концентрацией в этом анализе. Образцы инкубировали в течение 18 часов в RPMI1640 с добавлением 10% FBS при 37°C. Пан-Т-клетки, выделенные из РВМС, представляли собой эффекторные клетки, которые высевали в количестве 100 тыс. клеток/лунка.

Для всех экспериментальных условий клетки промывали и метили антителами поверхности Т-клеток. Следующие антитела использовали для мечения (1) CD4-положительных Т-клеток (конъюгированное с FITC антитело к CD4 человека), (2) CD8-положительных Т-клеток (конъюгированное с PE антитело к CD8а человека), (3) для активации CD69 (конъюгированное с Alexa Fluor 647 антитело к CD69 человека) (Biolegend). Затем клетки анализировали на BD Celesta с использованием соответствующих матриц для измерения активации CD69.

Результаты исследований активации Т-клеток показаны на следующих фигурах: На фиг. 17-18, фиг. 27, панелях А-В (без покрытия антигеном ВСМА, с использованием РВМС); фиг. 30, панелях А-В (без покрытия PSМА); и фиг. 33, панелях А-В (без покрытия CD 19).

На фиг. 17 представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В общем, биспецифические антитела, содержащие последовательности Fc IgG1, активировали CD4+ Т-клеток при более низких концентрациях биспецифического антитела. Биспецифические антитела, содержащие последовательности Fc IgG4, активировали CD4+ Т-клетки при более высоких концентрациях биспецифического антитела. Примечательно, что активация CD4+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации РАА и КиН, была низкой, что свидетельствует о том, что введение мутаций РАА и КиН снижает независимую от ВСМА активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами.

На фиг. 18 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Как и в случае с CD4+ Т-клетками, биспецифические антитела, содержащие последовательности Fc IgG1, активировали CD8+ Т-клетки при более низких концентрациях биспецифического антитела. Биспецифические антитела, содержащие последовательности Fc IgG4, активировали CD8+ Т-клетки при более высоких концентрациях биспецифического антитела. Примечательно, что активация CD8+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации РАА и КиН, была низкой, что свидетельствует о том, что

введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от ВСМА активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами.

На фиг. 27, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Активация CD4+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была аналогична отрицательному контролю (gp120, CD3 (F2B)), демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от ВСМА активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами. На фиг. 27, панели В, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Как и в случае с CD4+ Т-клетками, активация CD8+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была аналогична отрицательному контролю, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от ВСМА активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами.

На фиг. 30, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Активация CD4+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была аналогична отрицательному контролю (gp120, CD3 (F2B)), демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от PSMA активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами. На фиг. 30, панели В, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Как и в случае с CD4+ Т-клетками, активация CD8+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была аналогична отрицательному контролю, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от PSMA активацию Т-клеток этими биспецифическими антителами.

На фиг. 33, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Активация CD4+ Т-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была значительно ниже, чем при использовании других конструкций

антител, которые не содержали мутации PAA и KiH, что свидетельствует о том, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от CD19 активацию T-клеток этими биспецифическими антителами. На фиг. 33, панели B, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ T-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Как и в случае с CD4+ T-клетками, активация CD8+ T-клеток, достигаемая с помощью биспецифических антител на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, была значительно ниже, чем при использовании других конструкций антител, не содержащих мутации PAA и KiH, что свидетельствует о том, что введение мутаций PAA и KiH снижает независимую от CD19 активацию T-клеток этими биспецифическими антителами.

Результаты активации CD8+ T-клеток с антигенным покрытием с использованием пан-T-клеток, выделенных из покоящихся PBMC, представлены на фиг. 19, фиг. 28, панели B, фиг. 31, панели B, и фиг. 34, панели B. Результаты активации CD4+ T-клеток с антигенным покрытием с использованием пан-T-клеток, выделенных из покоящихся PBMC, представлены на фиг. 28, панели A, фиг. 31, панели A, и фиг. 34, панели A. Концентрация антигенного покрытия для BCMA и PSMA составляла 1 мкг/мл, тогда как концентрация антигенного покрытия для CD19 составляла 10 мкг/мл.

На фиг. 19 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ T-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия BCMA, все биспецифические антитела активировали CD8+ T-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD8+ T-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD8+ T-клеток.

На фиг. 28, панели B, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ T-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия BCMA, все биспецифические антитела активировали CD8+ T-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD8+ T-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и

KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD8+ Т-клеток.

На фиг. 31, панели В, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия PSMA, все биспецифические антитела активировали CD8+ Т-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD8+ Т-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD8+ Т-клеток.

На фиг. 34, панели В, представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия CD19, все биспецифические антитела активировали CD8+ Т-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD8+ Т-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD8+ Т-клеток.

На фиг. 28, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия BCMA, все биспецифические антитела активировали CD4+ Т-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD4+ Т-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD4+ Т-клеток.

На фиг. 31, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия PSMA, все биспецифические антитела активировали CD4+ Т-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD4+ Т-клеток была достигнута

биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD4+ Т-клеток.

На фиг. 34, панели А, представлен график, изображающий %CD4+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. В отличие от случая экспериментов без покрытия CD 19, все биспецифические антитела активировали CD4+ Т-клетки при аналогичных концентрациях биспецифического антитела для клеток, покрытых антигеном. Примечательно, что активация CD4+ Т-клеток была достигнута биспецифическими антителами на основе Fc IgG4, которые содержали мутации PAA и KiH, демонстрируя, что введение мутаций PAA и KiH не устраняло активность этих молекул по активации CD4+ Т-клеток.

Результаты активации CD8+ Т-клеток без антигенного покрытия с использованием пан-Т-клеток, выделенных из покоящихся PBMC, представлены на фиг. 20, фиг. 29, панели В, фиг. 32, панели В, и фиг. 35, панели В. Результаты активации CD4+ Т-клеток без антигенного покрытия с использованием пан-Т-клеток, выделенных из покоящихся PBMC, представлены на фиг. 29, панели А, фиг. 32, панели А, и фиг. 35, панели А.

На фиг. 20 представлен график, изображающий %CD8+CD69+ Т-клеток в зависимости от концентрации биспецифических антител для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Эти результаты демонстрируют, что активация CD69 в CD8+ Т-клетках зависит от ВСМА для всех протестированных молекул биспецифических антител.

На фиг. 29, панели А и В, представлены графики, показывающие %CD4+CD69+ и %CD8+CD69+ Т-клеток, соответственно, в виде зависимости от концентрации биспецифического антитела для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Эти результаты демонстрируют, что активация CD69 в CD4+ и CD8+ Т-клетках зависит от ВСМА для всех протестированных молекул биспецифических антител. Активация CD69 была слегка увеличена как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках при более высоких концентрациях конструкций биспецифических антител, которые не содержали молчание мутации.

На фиг. 32, панели А и В, представлены графики, показывающие %CD4+CD69+ и %CD8+CD69+ Т-клеток, соответственно, в виде зависимости от концентрации биспецифического антитела для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Эти результаты демонстрируют, что активация CD69 в CD4+ и CD8+ Т-клетках зависит от PSMA для всех протестированных молекул биспецифических антител.

На фиг. 35, панели А и В, представлены графики, показывающие %CD4+CD69+ и %CD8+CD69+ Т-клеток, соответственно, в виде зависимости от концентрации биспецифического антитела для конструкций биспецифического антитела, приведенных в легенде. Эти результаты демонстрируют, что активация CD69 в CD4+ и CD8+ Т-клетках зависит от CD19 для всех протестированных молекул биспецифических антител. Активация CD69 была слегка увеличена как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках при более высоких концентрациях конструкций биспецифических антител, которые не содержали молчащие мутации.

#### Пример 10. Лизис опухолевых клеток

Биспецифические антитела к CD3xBCMA анализировали на способность уничтожать три различные BCMA+ опухолевые клетки и одну BCMA-отрицательную линию клеток посредством перенаправления активированных первичных Т-клеток. В этом эксперименте опухолевые клетки смешивали с активированными пан-Т-клетками в соотношении 10:1 Е:Т вместе с добавлением биспецифического антитела. Результаты приведены на фиг. 21, панелях А-Д. На панели А показано уничтожение клеток RPMI-8226, на панели В показано уничтожение клеток NCI-H929, на панели С показано уничтожение клеток U-266, а на панели D показано уничтожение клеток K562, отрицательный контроль. По оси X показана концентрация использованного антитела, а по оси Y показан % лизиса опухолевых клеток через 6 часов после добавления антитела.

Уровень высвобождения цитокина IL-2 измеряли после того, как покоящиеся Т-клетки человека культивировали с различными линиями опухолевых клеток и возрастающими дозами биспецифического антитела к CD3xBCMA. На фиг. 22, панели А, показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками RPMI-8226, на фиг. 22, панели В, показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками NCI-H929. На фиг. 22, панели С, показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками U-266, и на фиг. 22, панели D, показано высвобождение IL-2, стимулированное клетками K562, отрицательный контроль.

Уровень высвобождения цитокина IFN- $\gamma$  измеряли после того, как покоящиеся Т-клетки человека культивировали с различными линиями опухолевых клеток и возрастающими дозами биспецифического антитела к CD3xBCMA. На фиг. 23, панели А, показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками RPMI-8226, на фиг. 23, панели В, показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками NCI-H929, на фиг. 23, панели С, показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками U-266, и на фиг. 23, панели D, показано высвобождение IFN- $\gamma$ , стимулированное клетками K562, отрицательный контроль.

Несмотря на то что в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения и, что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквивалентов.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное полиспецифическое антитело, содержащее:

первую полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую мутантную константную область IgG4 человека, содержащую мутации S228P, F234A, L235A и T366W; и

вторую полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую мутантную константную область IgG4 человека, содержащую мутации S228P, F234A, L235A, T366S, L368A и Y407V.

2. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что в мутированной константной области IgG4 человека первой полипептидной субъединицы тяжелой цепи или в мутированной константной области IgG4 человека второй полипептидной субъединицы тяжелой цепи отсутствует домен CH1.

3. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что мутантная константная область IgG4 человека первой полипептидной субъединицы тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 73 или 55, а мутированная константная область IgG4 человека второй полипептидной субъединицы тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 72 или 54.

4. Выделенное полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–3, дополнительно содержащее первый связывающий фрагмент, имеющий специфичность связывания в отношении CD3, содержащее:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 37, и последовательность CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39, последовательность CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и последовательность CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

5. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 4, отличающееся тем, что:

последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельном домене тяжелой цепи первого связывающего фрагмента присутствуют в каркасной области VH человека; и

последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельном домене легкой цепи первого связывающего фрагмента присутствуют в каркасной области V-каппа человека.

6. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 5, отличающееся тем, что:

вариабельный домен тяжелой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 42; и

вариабельный домен легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 43.

7. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 6, отличающееся тем, что:

вариабельный домен тяжелой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 42; и

вариабельный домен легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит последовательность SEQ ID NO: 43.

8. Выделенное полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–7, дополнительно содержащее второй связывающий фрагмент, имеющий специфичность связывания с белком, отличным от CD3.

9. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 8, отличающееся тем, что второй связывающий фрагмент содержит одну вариабельную область тяжелой цепи в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

10. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 9, отличающееся тем, что первый связывающий фрагмент содержит полипептидную субъединицу легкой цепи и полипептидную субъединицу тяжелой цепи, а второй связывающий фрагмент содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи.

11. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 10, отличающееся тем, что полипептидная субъединица легкой цепи первого связывающего фрагмента содержит константный домен легкой цепи.

12. Выделенное полиспецифическое антитело по любому из пп. 8–11, отличающееся тем, что белок, отличный от CD3, представляет собой опухолеассоциированный антиген (ТАА – англ.: tumor-associated antigen) или опухолеспецифический антиген (TSA – англ.: tumor-specific antigen).

13. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 12, отличающееся тем, что ТАА представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA – англ.: B-cell maturation antigen).

14. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 12, отличающееся тем, что ТАА представляет собой CD19.

15. Выделенное полиспецифическое антитело по п. 12, отличающееся тем, что ТАА представляет собой простат-специфический мембранный антиген (PSMA – англ.: prostate specific membrane antigen).

16. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–15.

17. Полинуклеотид, кодирующий полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–15.

18. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 17.

19. Клетка, содержащая вектор по п. 18.

20. Способ получения полиспецифического антитела по любому из пп. 1–15, включающий культивирование клетки по п. 19 в условиях, подходящих для экспрессии полиспецифического антитела, и выделение полиспецифического антитела из клетки.

21. Способ лечения, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы полиспецифического антитела по любому из пп. 1–15 или фармацевтической композиции по п. 16.

22. Применение полиспецифического антитела по любому из пп. 1–15 при получении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида.

23. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–15 или фармацевтическая композиция по п. 16 для применения в терапии у нуждающегося в этом индивида.

24. Способ лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией ВСМА, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы полиспецифического антитела по п. 13 или фармацевтической композиции, содержащей полиспецифическое антитело по п. 13.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что заболевание представляет собой злокачественное новообразование.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой миелому.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что миелома представляет собой множественную миелому.

29. Способ лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией PSMA, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы полиспецифического антитела по п. 15 или фармацевтической композиции, содержащей полиспецифическое антитело по п. 15.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что заболевание представляет собой злокачественное новообразование.

31. Способ по п. 29, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой рак предстательной железы.

32. Способ лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы полиспецифического антитела по п. 14 или фармацевтической композиции, содержащей полиспецифическое антитело по п. 14.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДККЛ).

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

35. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ).

36. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой системную красную волчанку (СКВ).

37. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой ревматоидный артрит (РА).

38. Способ по п. 32, отличающийся тем, что нарушение представляет собой рассеянный склероз (РС).

39. Набор для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида, содержащий полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–15 или фармацевтическую композицию по п. 16, и инструкции по применению.

40. Набор по п. 39, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный реактив.

41. Набор по п. 40, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный реактив включает химиотерапевтическое лекарственное средство.

42. Биспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула, содержащая:  
первую полипептидную субъединицу, содержащую:  
вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий последовательность SEQ ID NO: 43; и  
константный домен легкой цепи (CL);  
вторую полипептидную субъединицу, содержащую:  
вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 42; и  
константный домен тяжелой цепи (CH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 72 или 73;

причем переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи вместе образуют первый связывающий фрагмент, который связывается с CD3; и

третью полипептидную субъединицу, содержащую:

переменную область только тяжелой цепи в одновалентной или двухвалентной конфигурации, которая связывается с белком, отличным от CD3; и

константный домен тяжелой цепи (CH), содержащий последовательность SEQ ID NO: 54 или 55.

43. Биспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п. 42, отличающаяся тем, что третья полипептидная субъединица содержит переменную область только из тяжелой цепи в двухвалентной конфигурации, которая связывается с ВСМА.

44. Биспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п. 43, содержащая:

первую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 49;

вторую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 56; и

Третью полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 58.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу по любому из пп. 42–44.

46. Полинуклеотид, кодирующий биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу по любому из пп. 42–44.

47. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 46.

48. Клетка, содержащая вектор по п. 47.

49. Способ получения биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы по любому из пп. 42–44, включающий культивирование клетки по п. 48 в условиях, подходящих для экспрессии биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы, и выделение биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы из клетки.

50. Способ лечения, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы по любому из пп. 42–44 или фармацевтической композиции по п. 45.

51. Применение биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы по любому из пп. 42–44 в получении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида.

52. Биспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по любому из пп. 42–44 или фармацевтическая композиция по п. 45 для применения в терапии у нуждающегося в этом индивида.

53. Способ лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией ВСМА, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективной дозы биспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы по любому из пп. 42–44 или фармацевтической композиции по п. 45.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

55. Способ по п. 53, отличающийся тем, что заболевание представляет собой злокачественное новообразование.

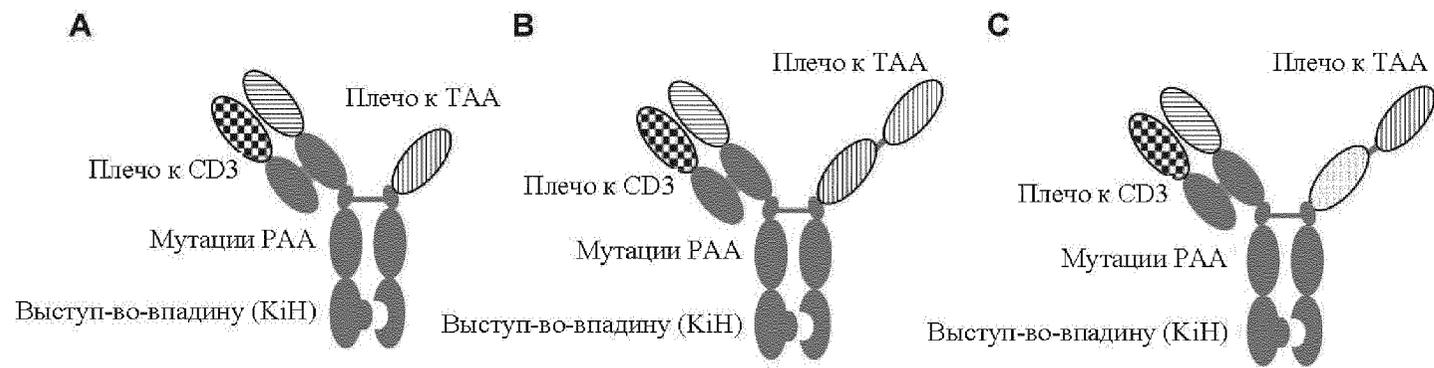
56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой миелому.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что миелома представляет собой множественную миелому.

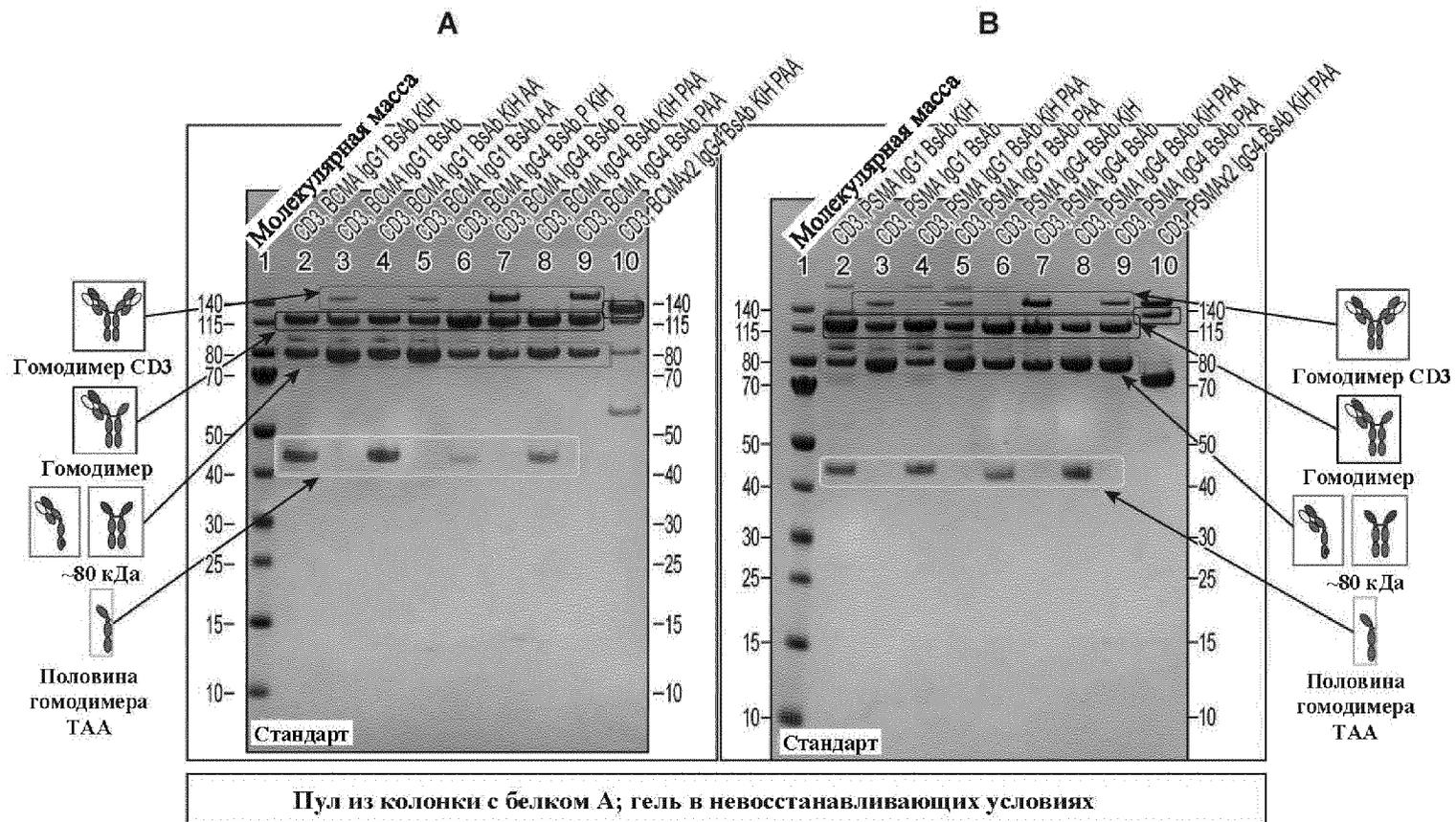
58. Набор для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом индивида, содержащий биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу по любому из пп. 42–44 или фармацевтическую композицию по п. 45 и инструкции по применению.

59. Набор по п. 58, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный реактив.

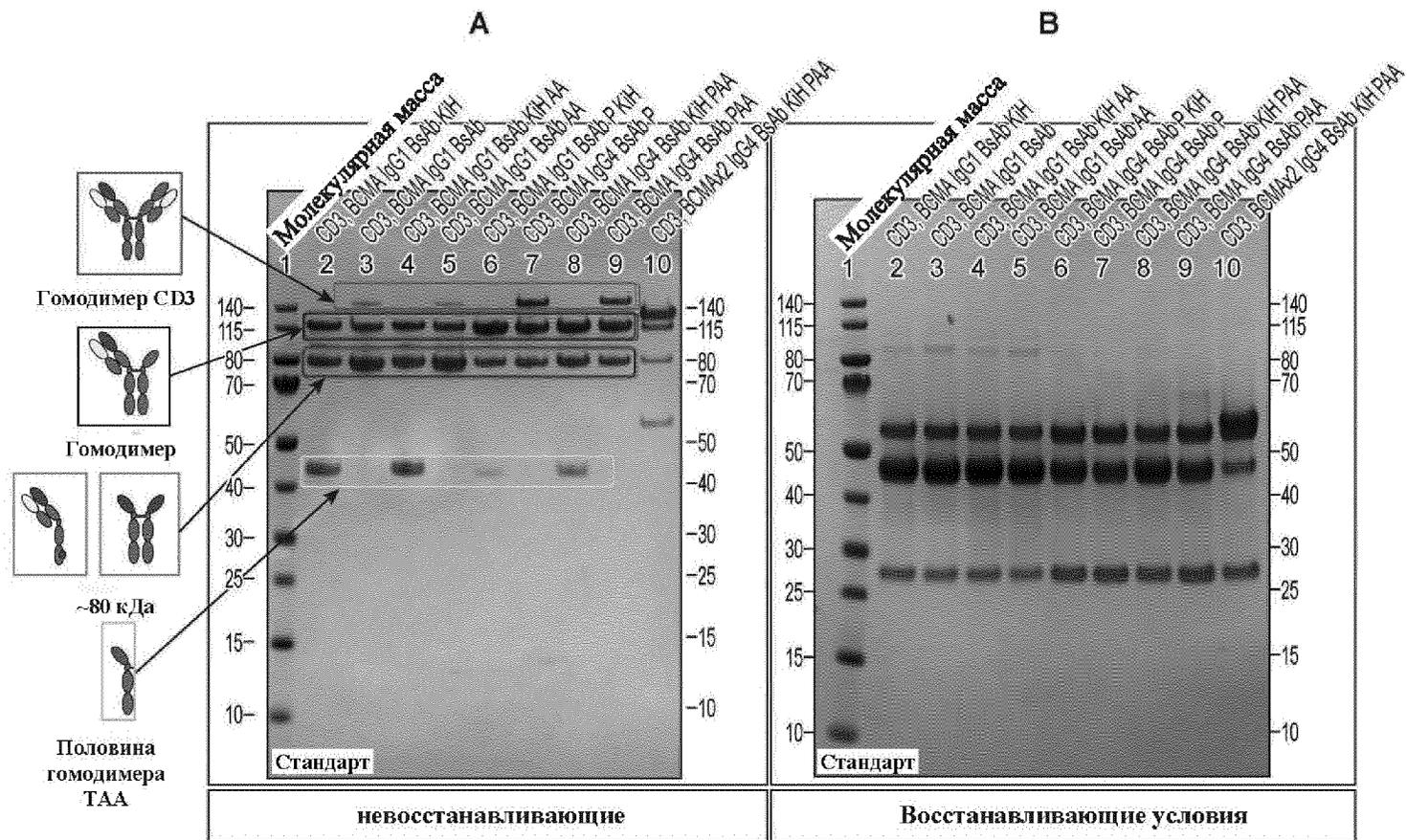
60. Набор по п. 59, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный реактив включает химиотерапевтическое лекарственное средство.



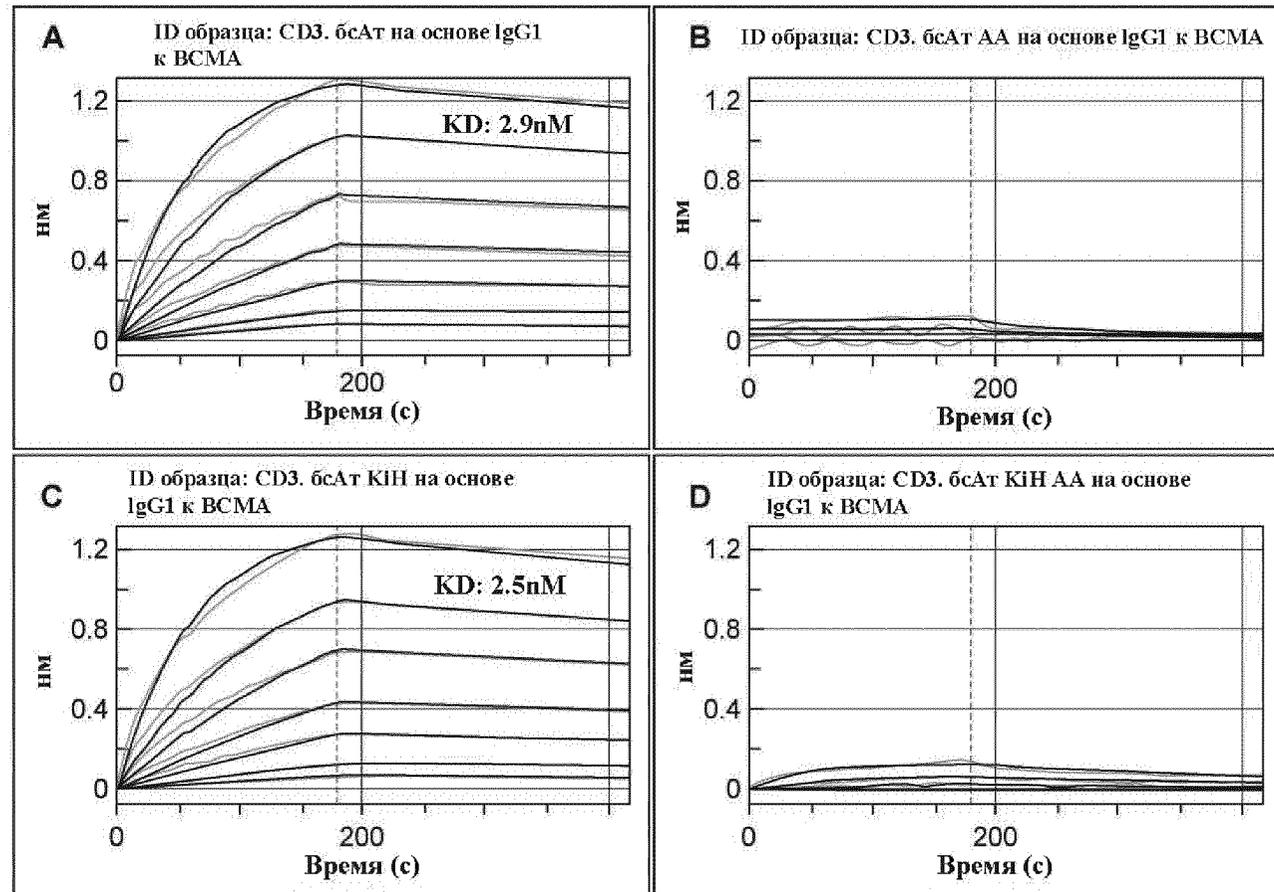
Фиг. 1



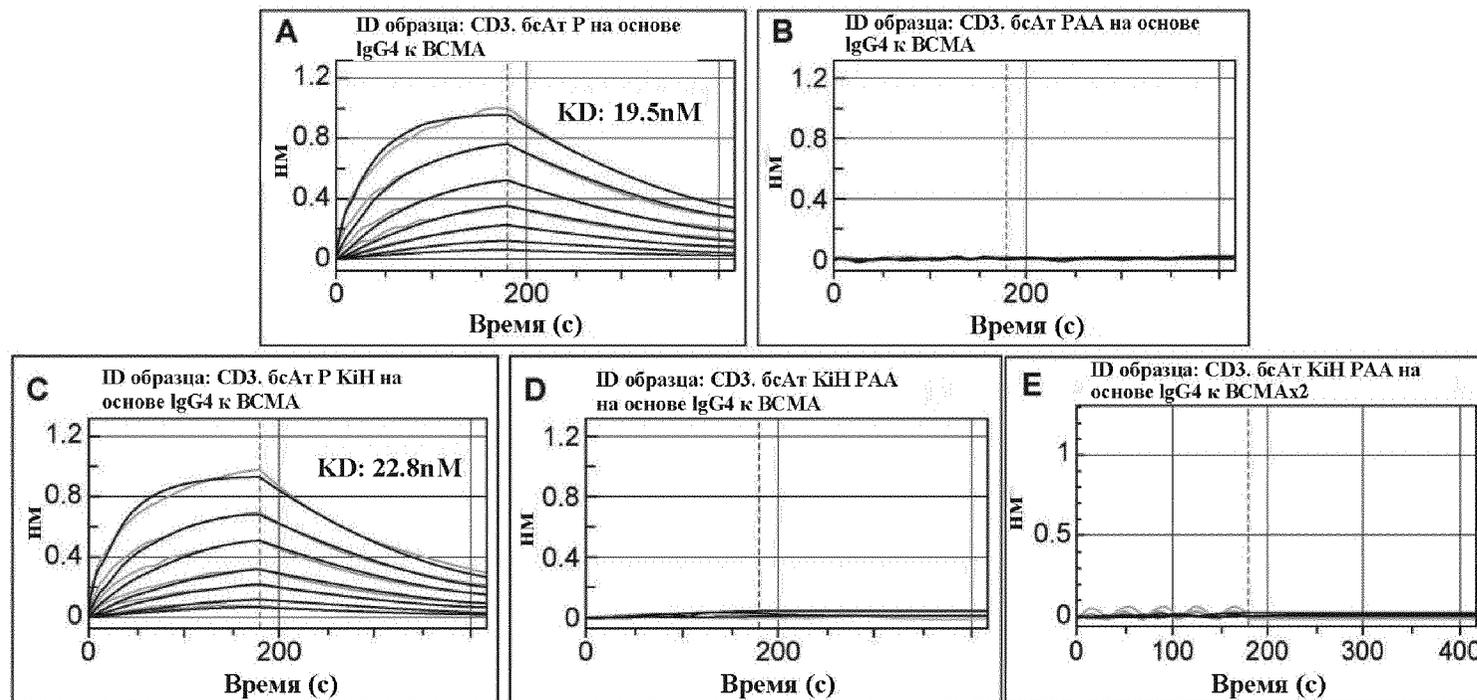
Фиг. 2



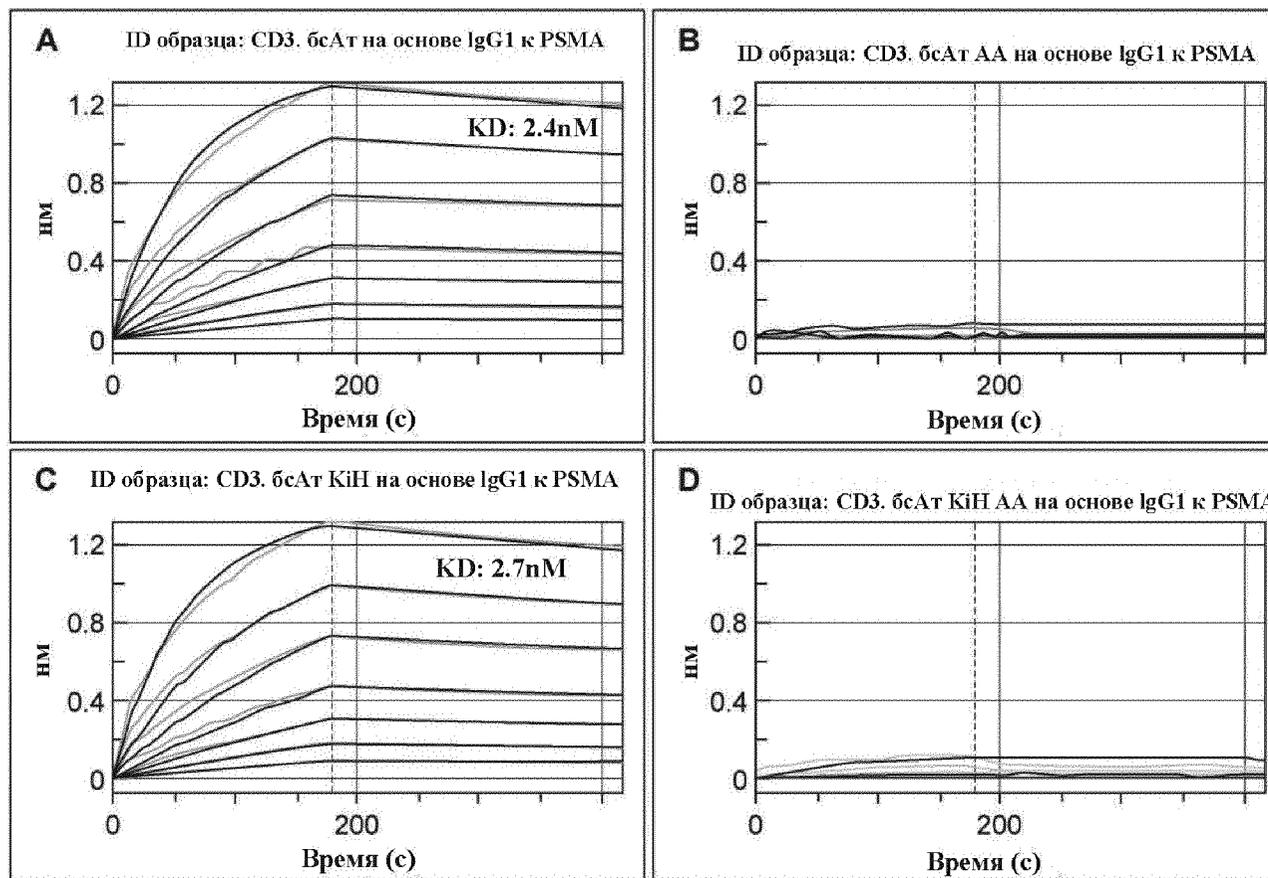
Фиг. 3



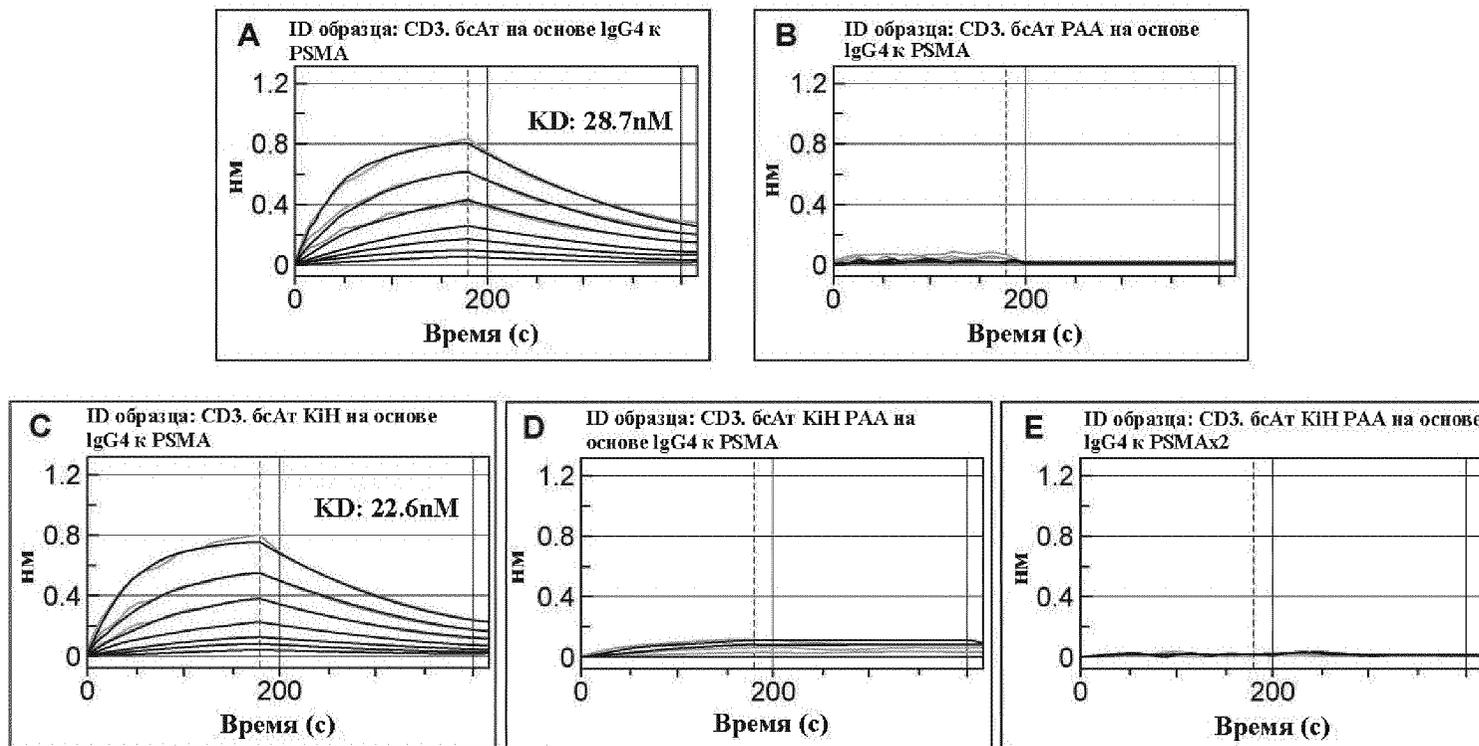
Фиг. 4



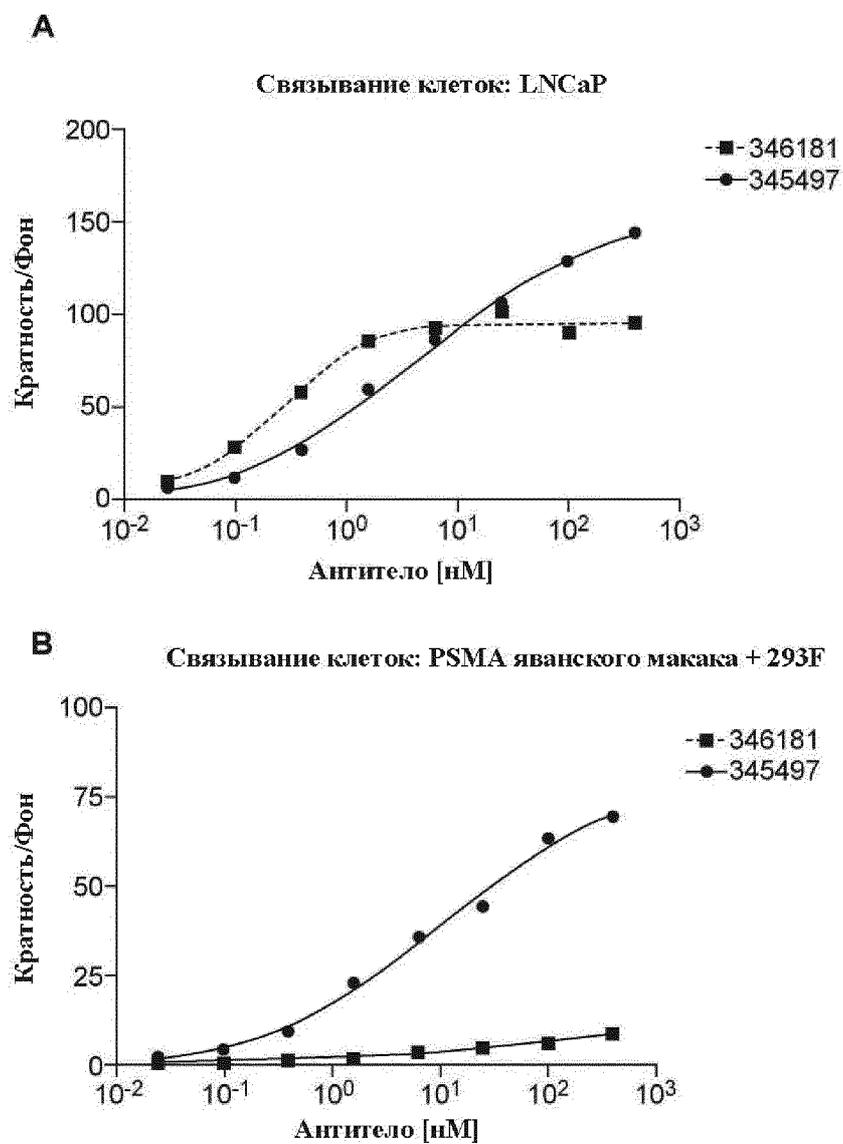
Фиг. 5



Фиг. 6

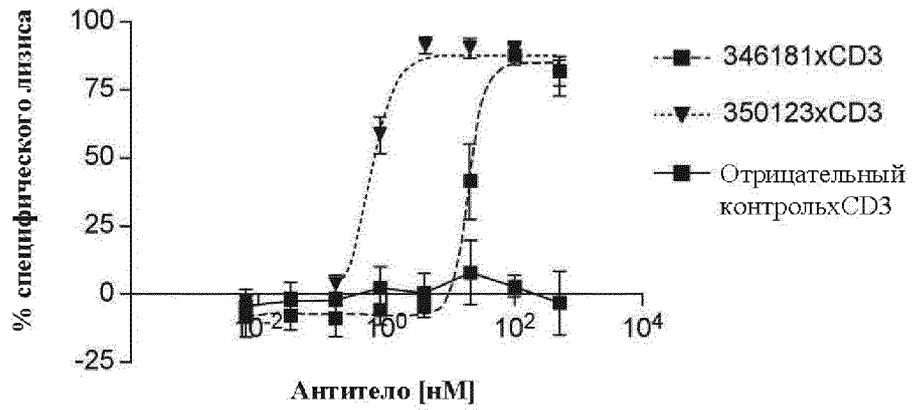


Фиг. 7



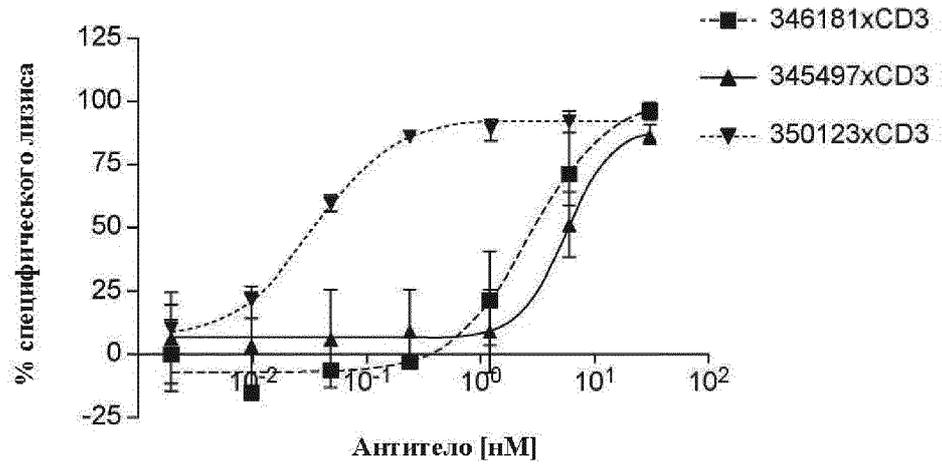
Фиг. 8

Опосредованный Т-клетками лизис  
PSMA-положительных клеток  
с использованием нестимулированных  
Т-клеток



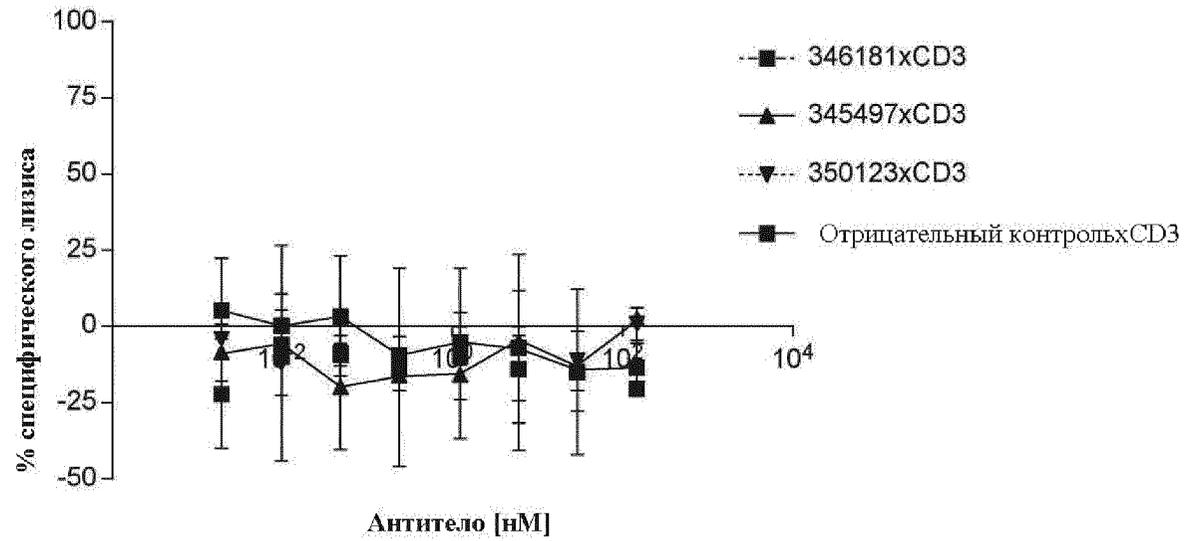
Фиг. 9

Опосредованный Т-клетками лизис  
PSMA-положительных клеток  
с использованием предварительно  
активированных Т-клеток



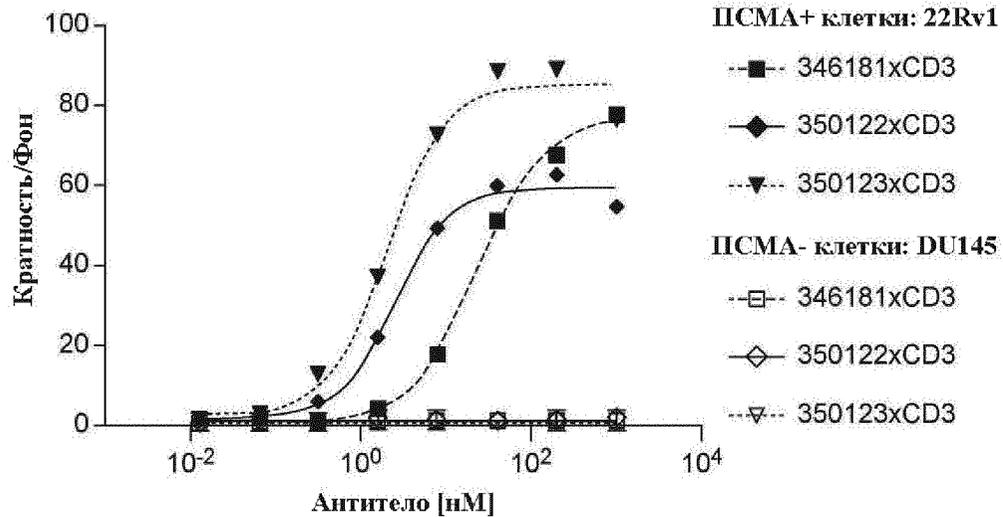
Фиг. 10

Биспецифические антитела не  
лизируют  
PSMA-отрицательные клетки



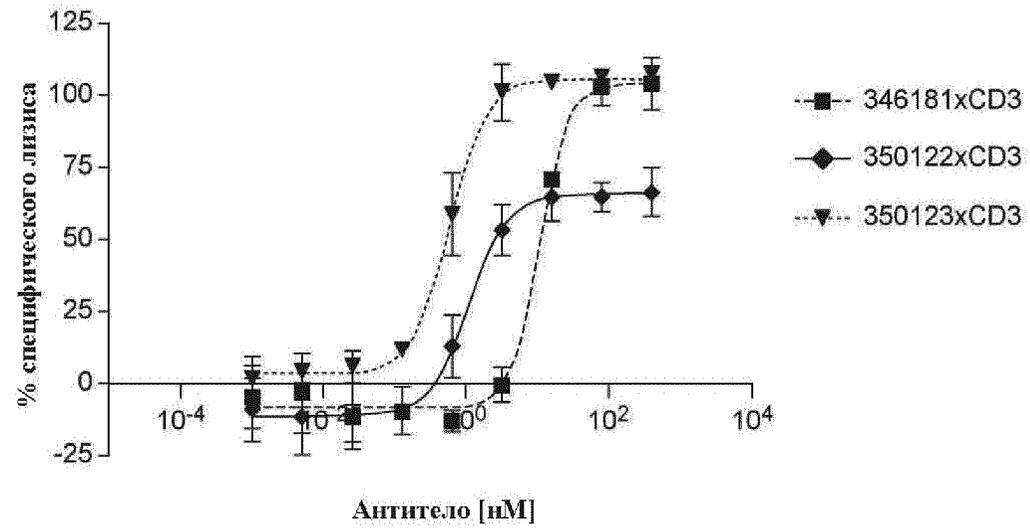
Фиг. 11

Связывание биспецифических антител к  
PSMAxCD3 с  
Положительные и отрицательные по PSMA  
клетки

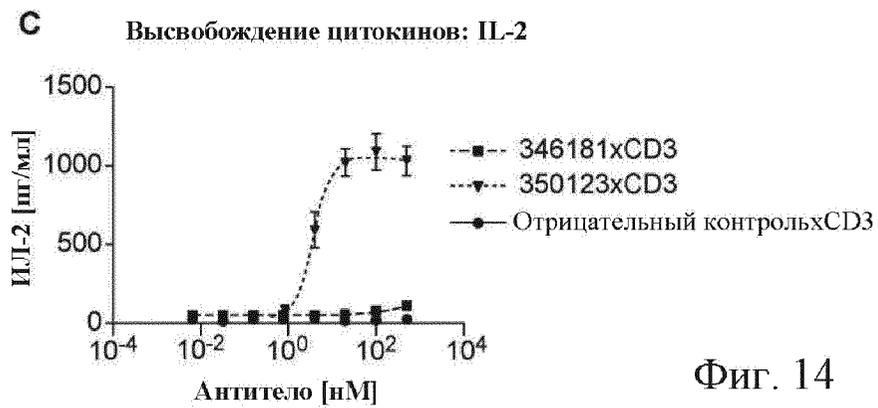
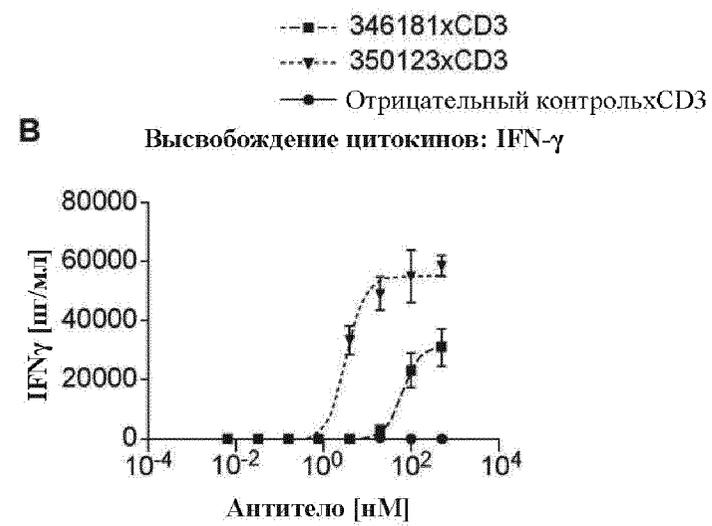
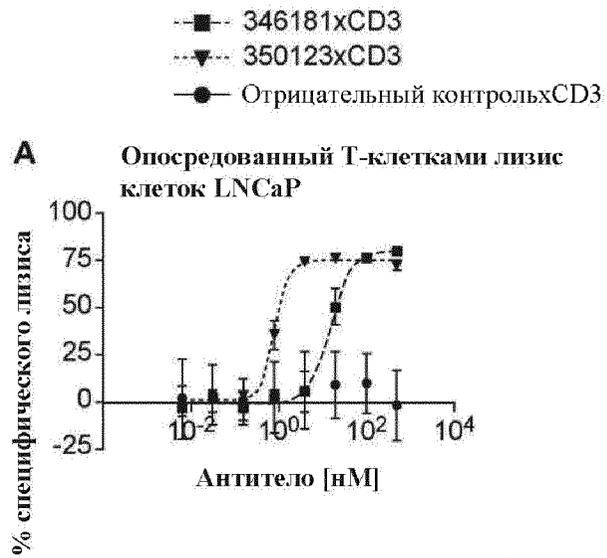


Фиг. 12

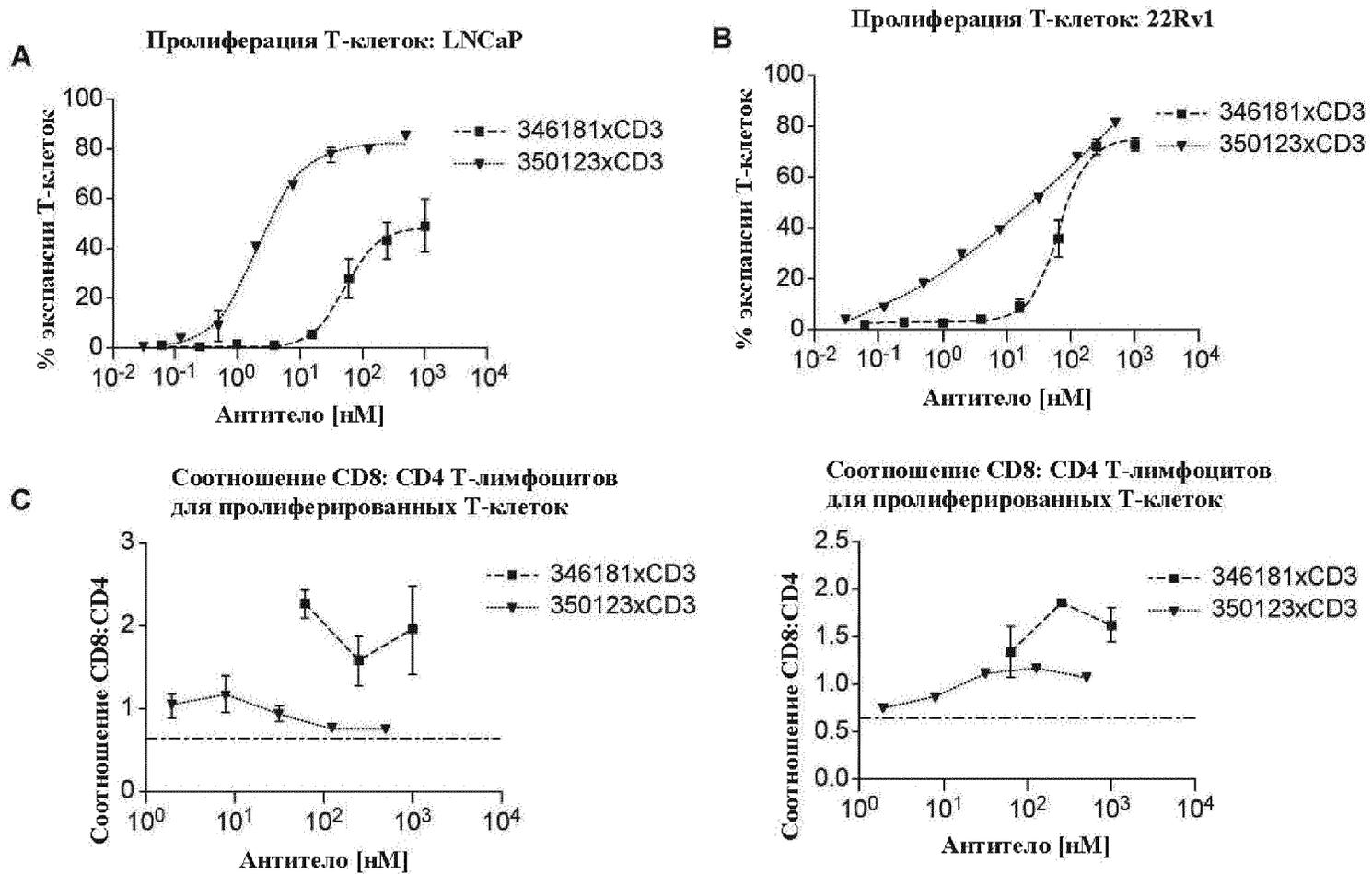
Опосредованный Т-  
клетками лизис ПСМА-  
положительных клеток



Фиг. 13

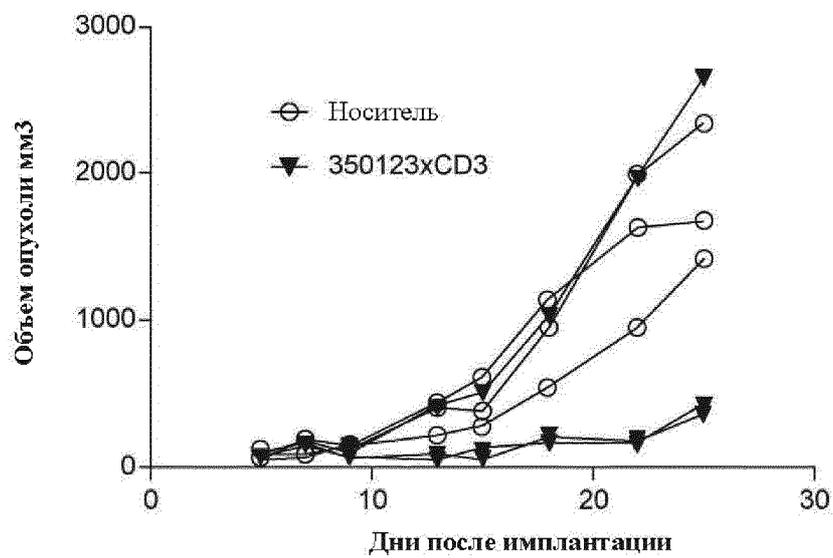


Фиг. 14

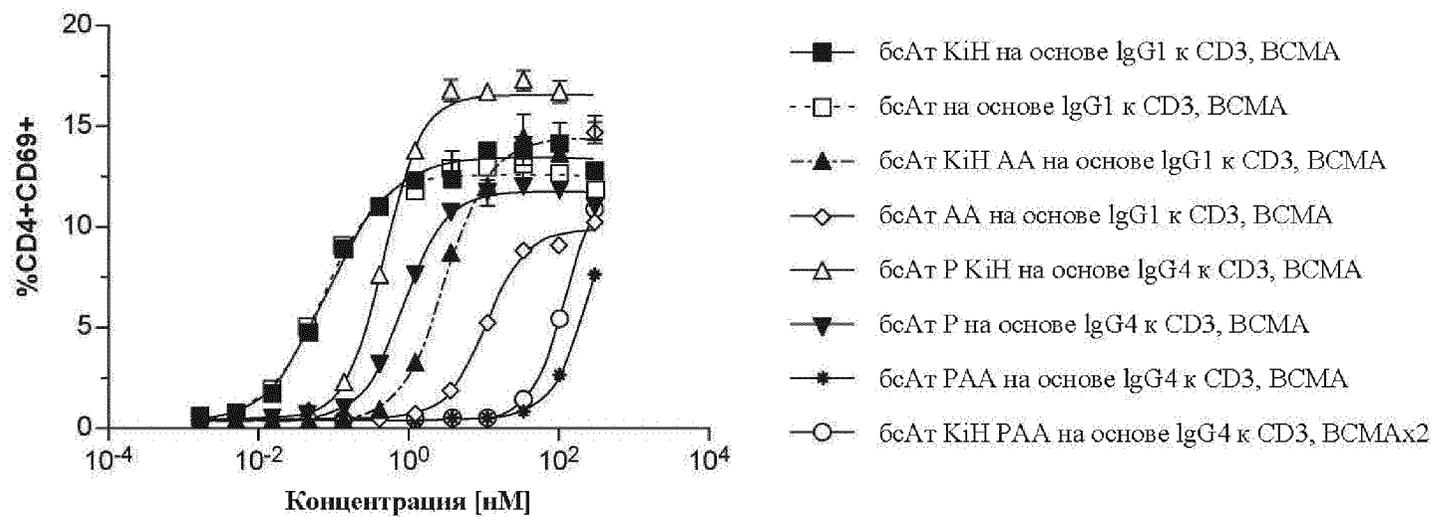


Фиг. 15

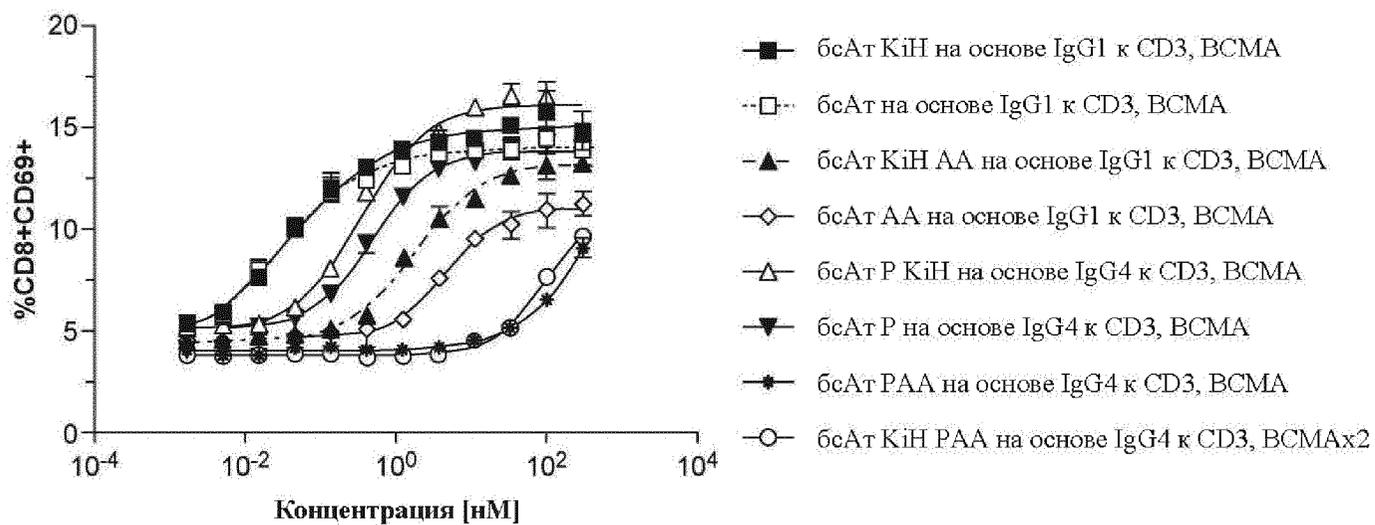
## Ксенотрансплантат 22Rv1



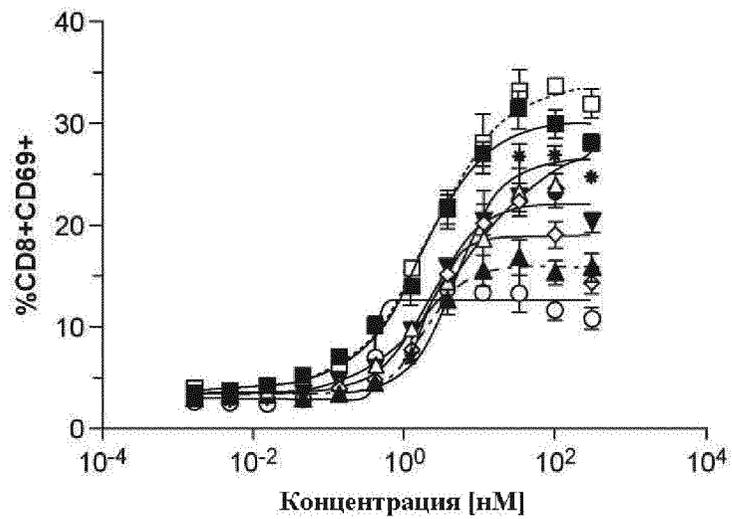
Фиг. 16



Фиг. 17

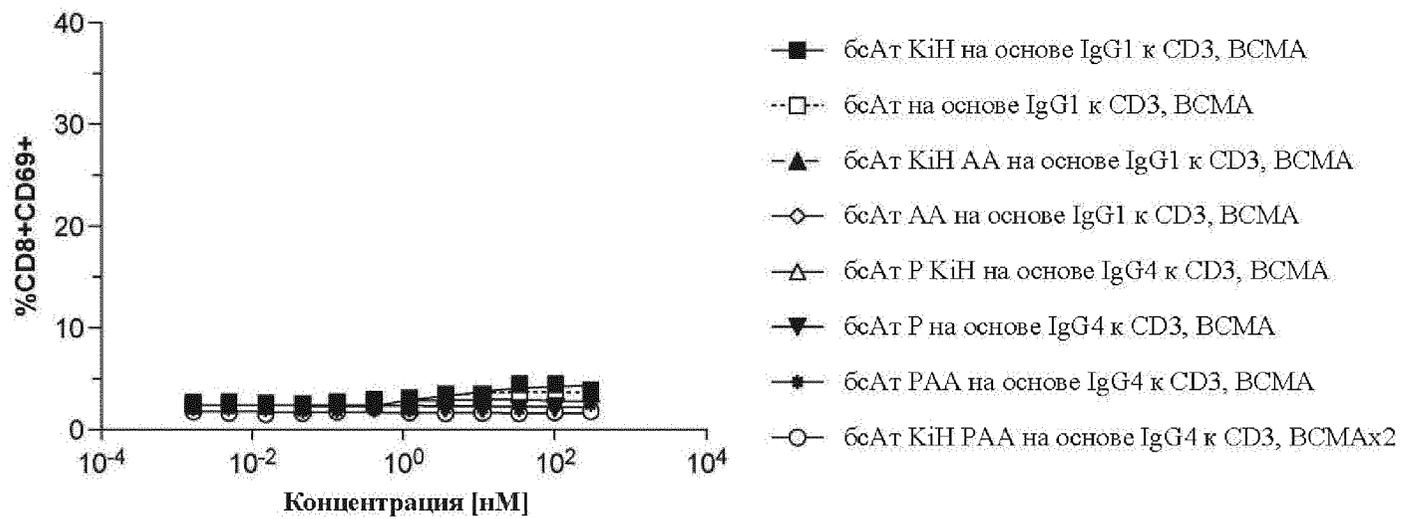


Фиг. 18

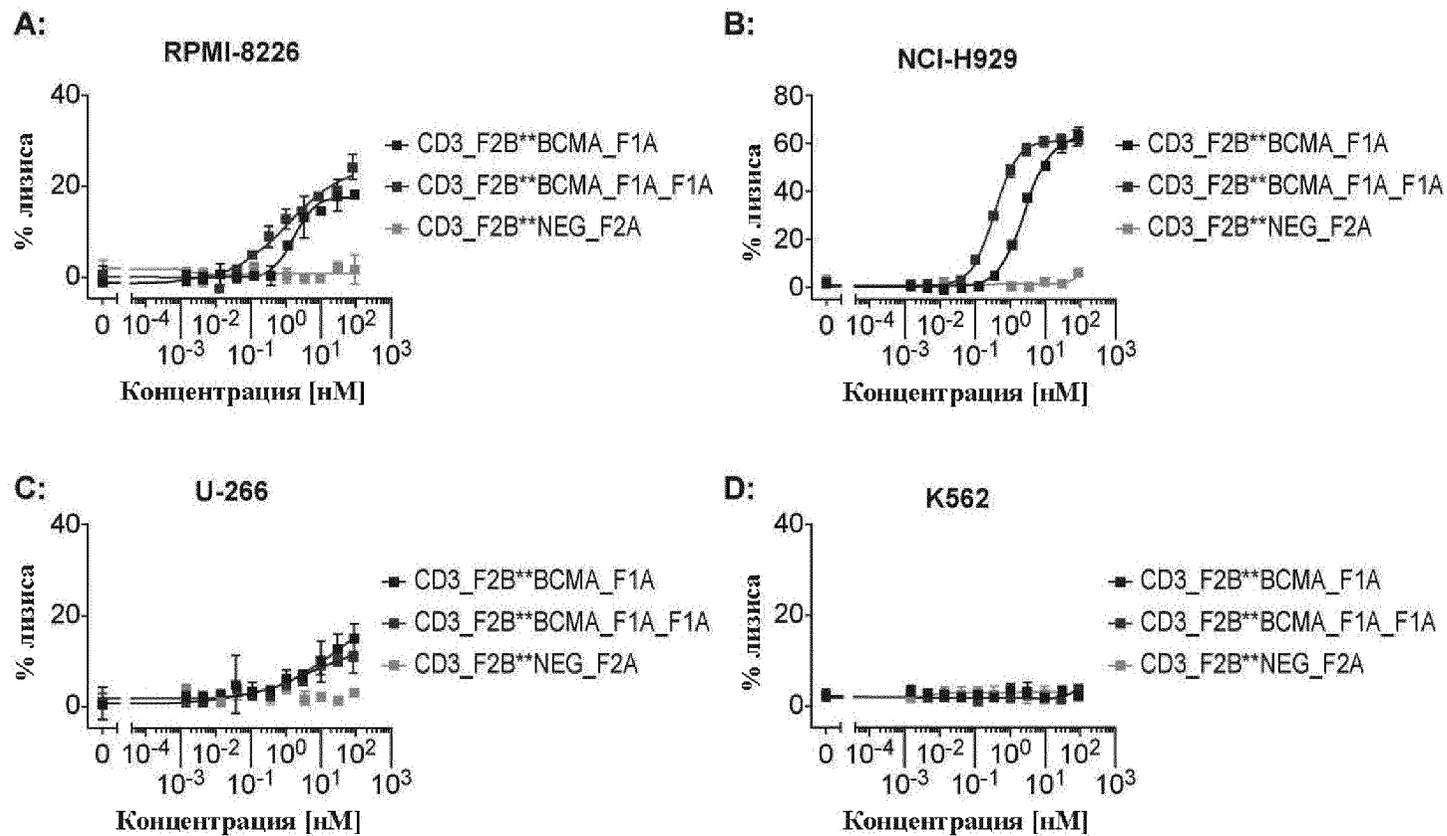


- бсАт КіН на основе IgG1 к CD3, ВСМА
- бсАт на основе IgG1 к CD3, ВСМА
- ▲ бсАт КіН АА на основе IgG1 к CD3, ВСМА
- ◇ бсАт АА на основе IgG1 к CD3, ВСМА
- △ бсАт Р КіН на основе IgG4 к CD3, ВСМА
- ▼ бсАт Р на основе IgG4 к CD3, ВСМА
- \* бсАт РАА на основе IgG4 к CD3, ВСМА
- бсАт КіН РАА на основе IgG4 к CD3, ВСМАx2

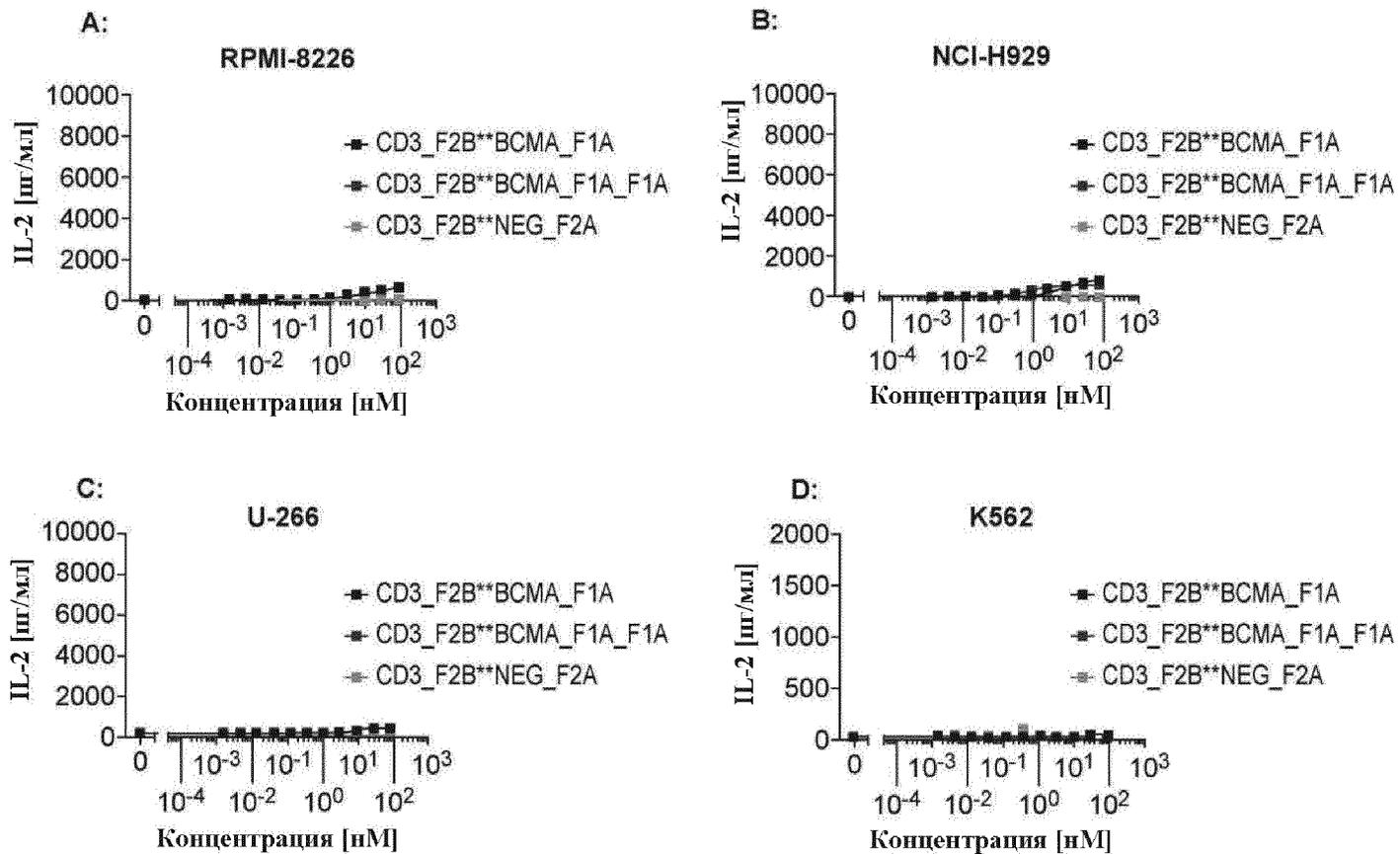
Фиг. 19



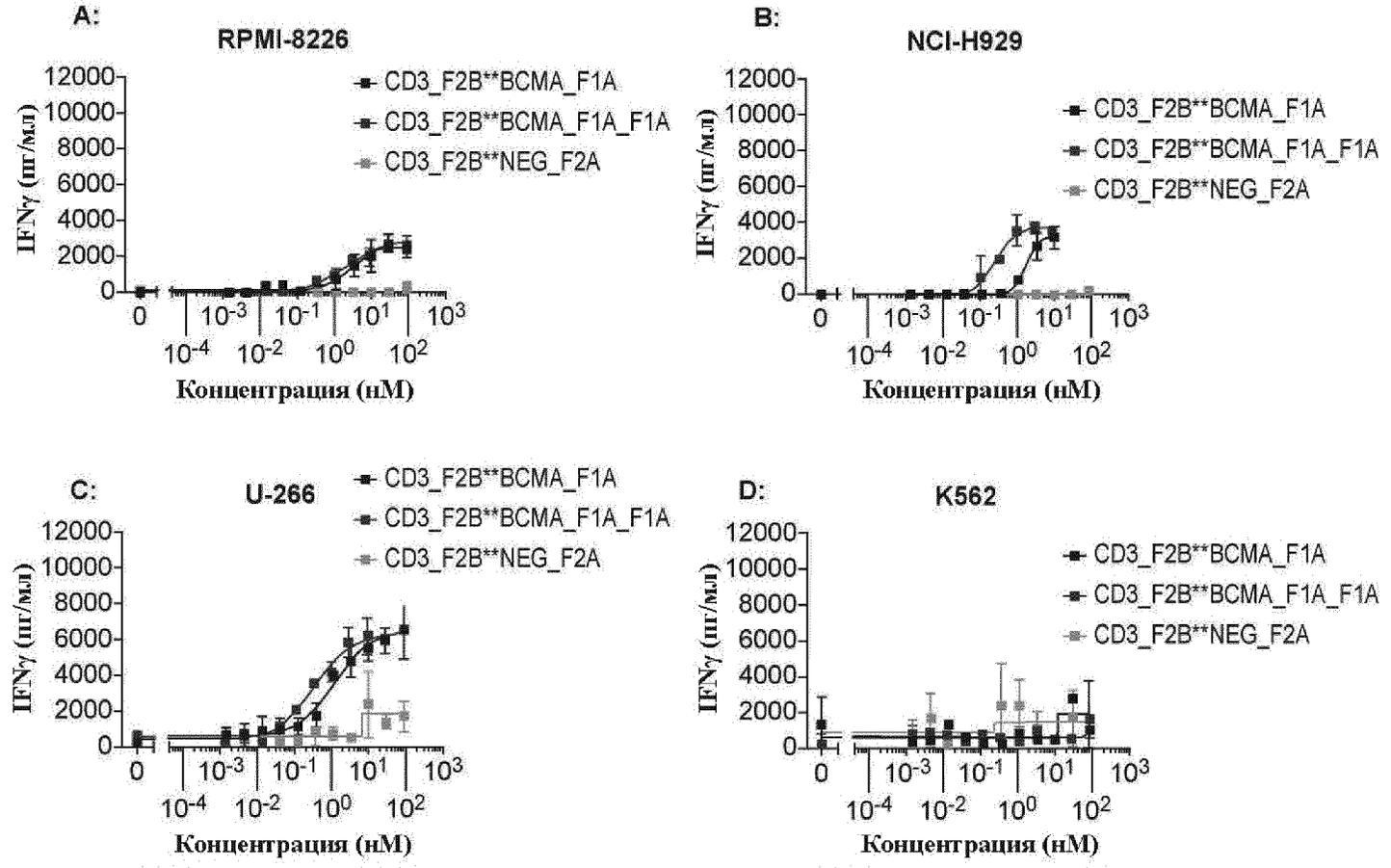
Фиг. 20



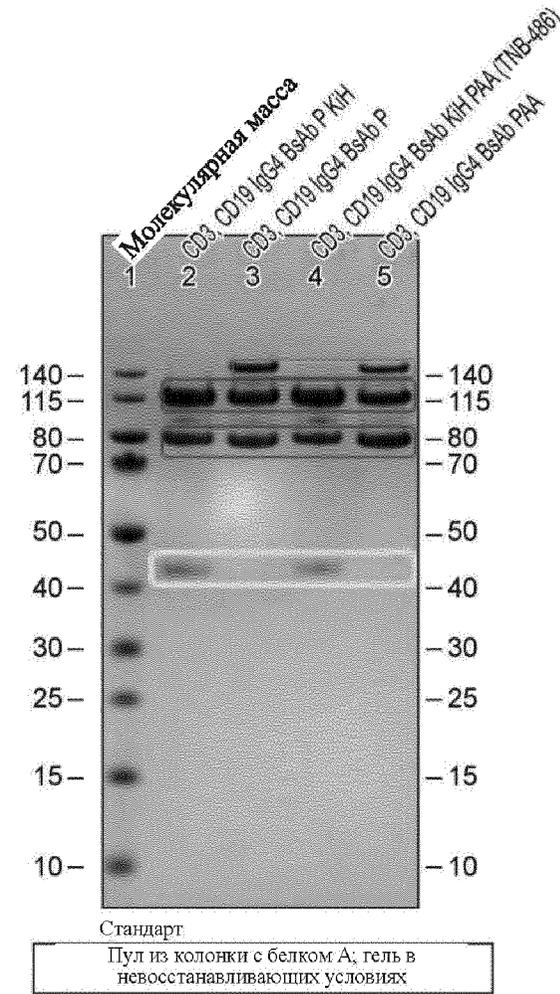
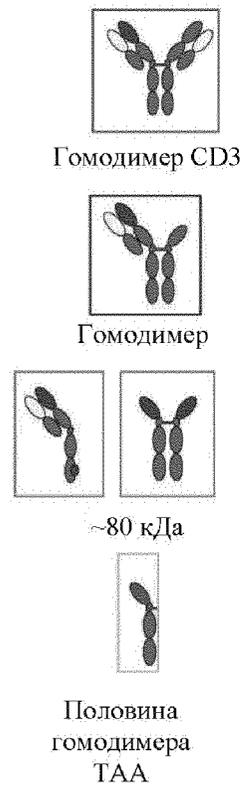
Фиг. 21



Фиг. 22



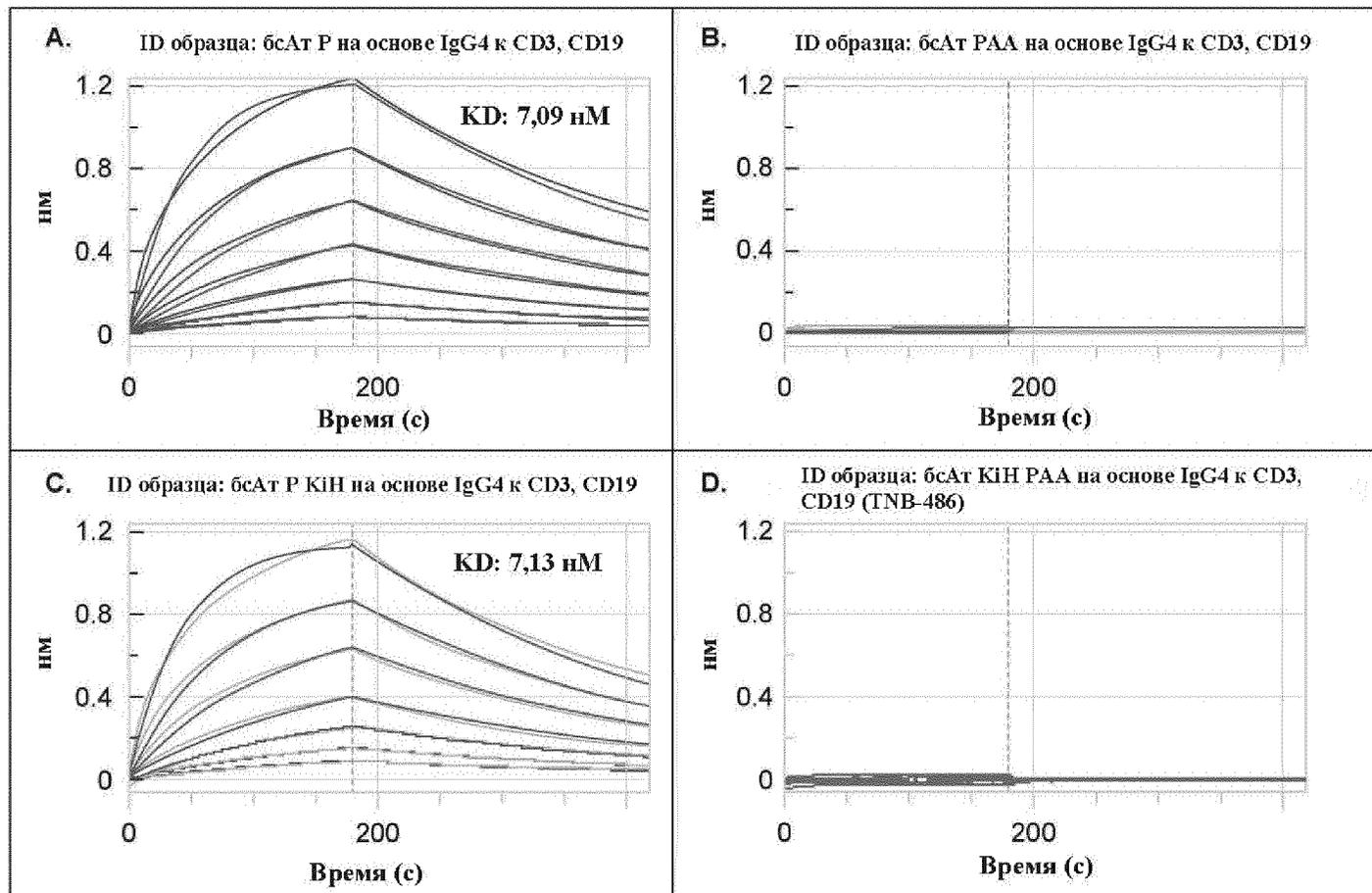
Фиг. 23



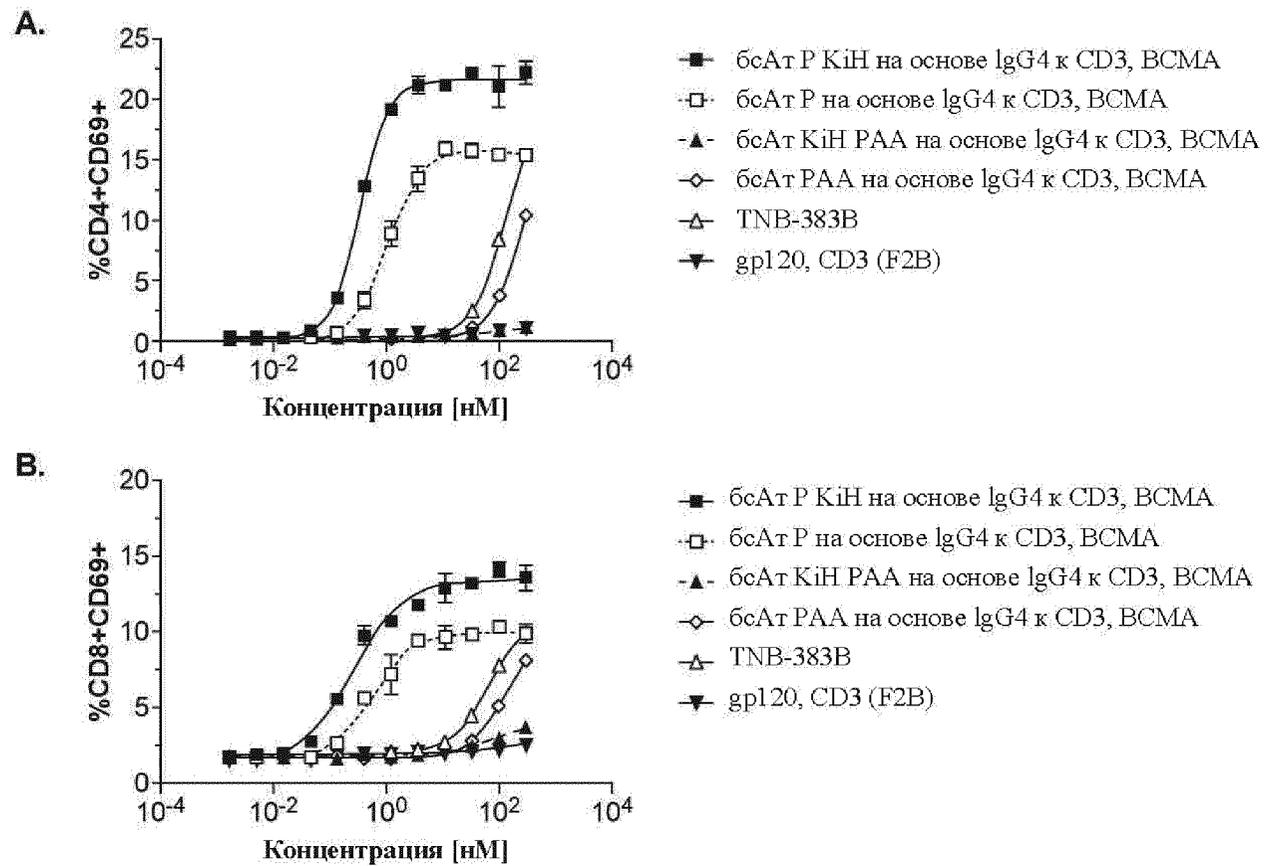
Фиг. 24

номер экспрессии	Формат	% ВМВ	% мономеров	% НМВ
385171_394399_312325	бсАт Р КиН на основе IgG4 к CD3, CD19	0,10	99,9	0,0
385173_394256_312325	бсАт Р на основе IgG4 к CD3, CD19	2,33	97,7	0,0
318390_338683_312325	бсАт КиН РАА на основе IgG4 к CD3, CD19 (TNB-486)	0,05	99,9	0,07
316220_394259_312325	бсАт РАА на основе IgG4 к CD3, CD19	2,09	97,9	0,0

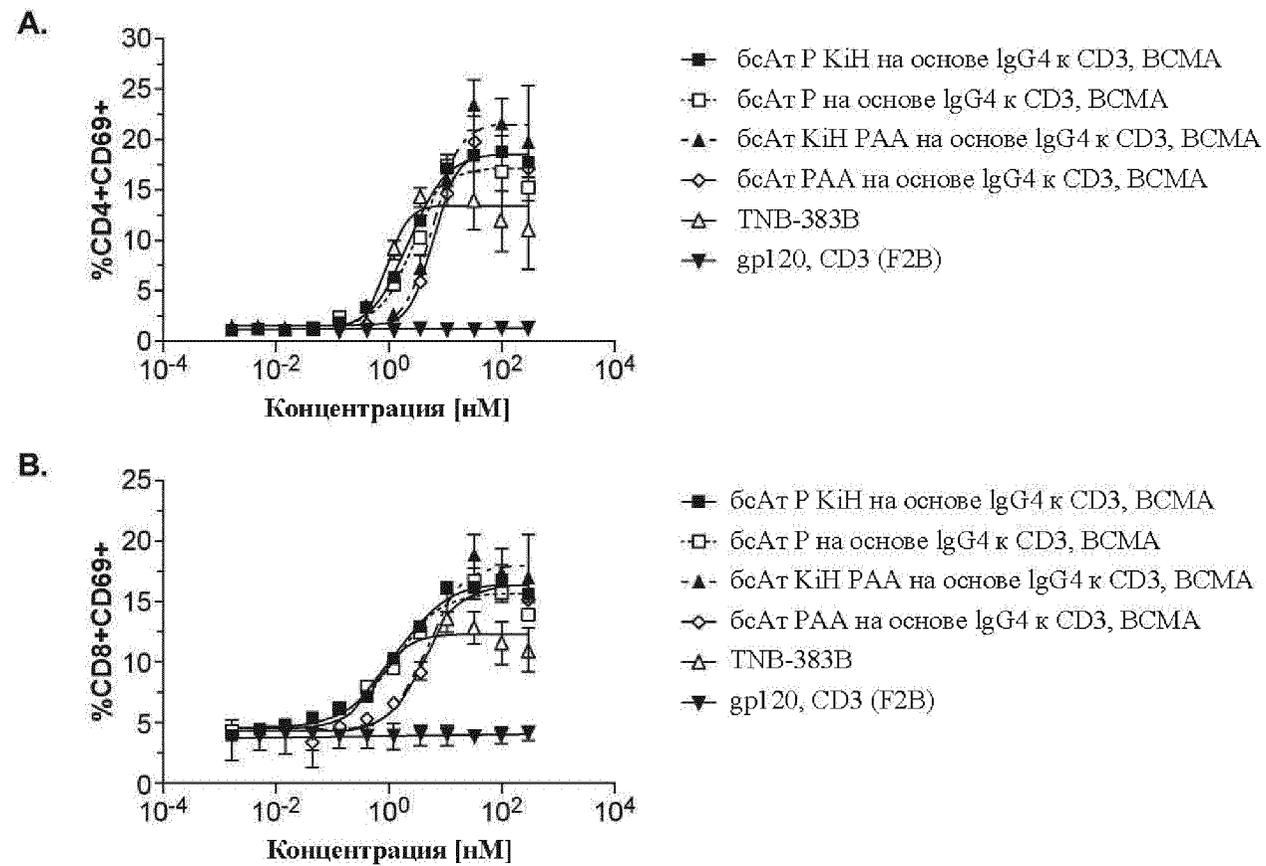
Фиг. 25



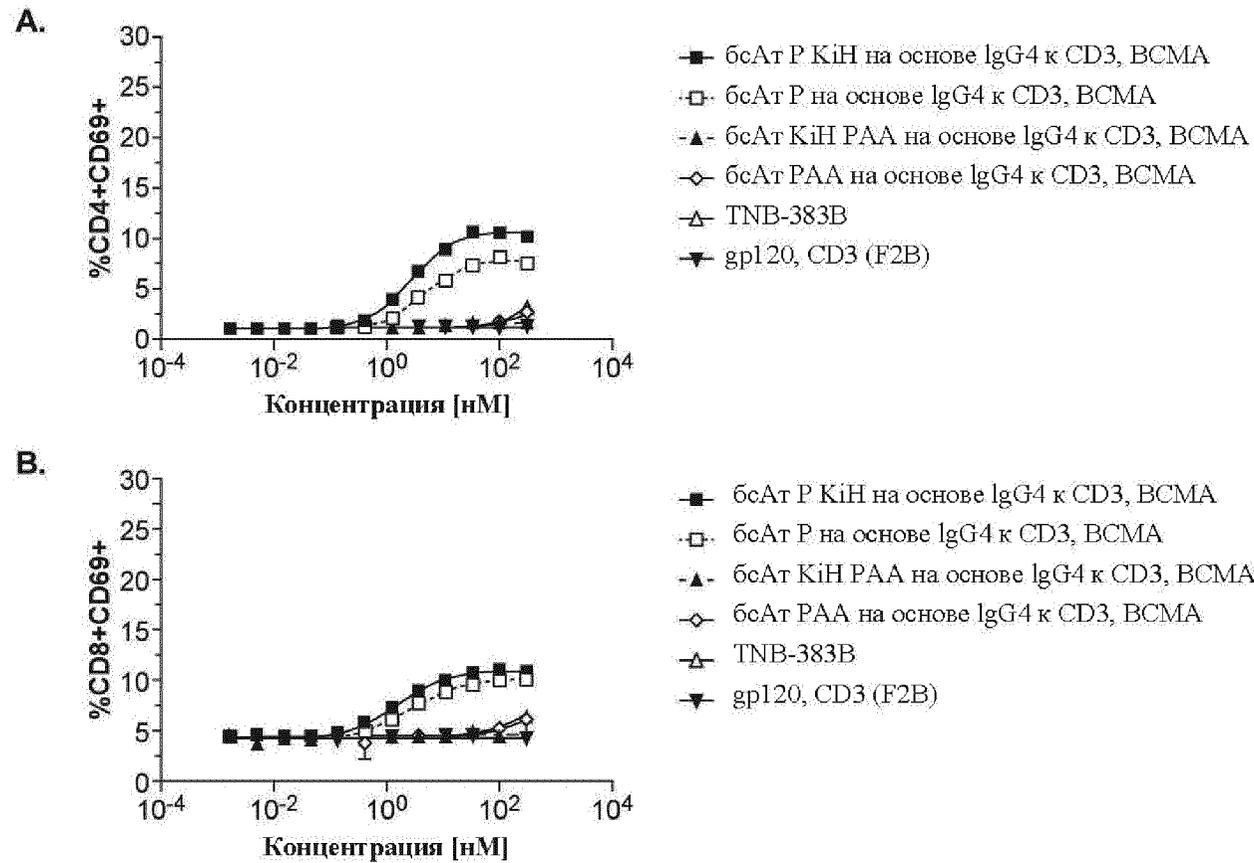
Фиг. 26



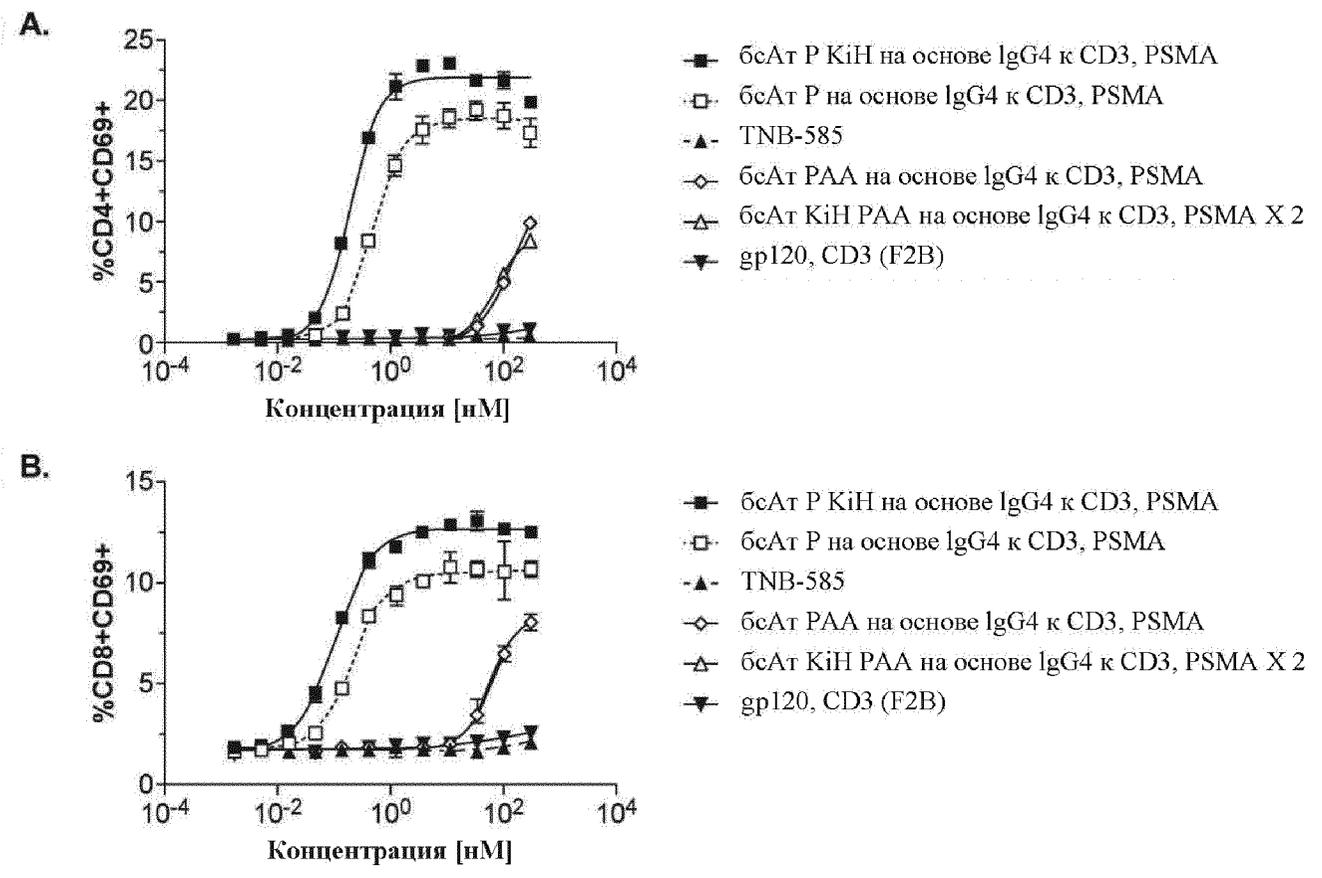
Фиг. 27



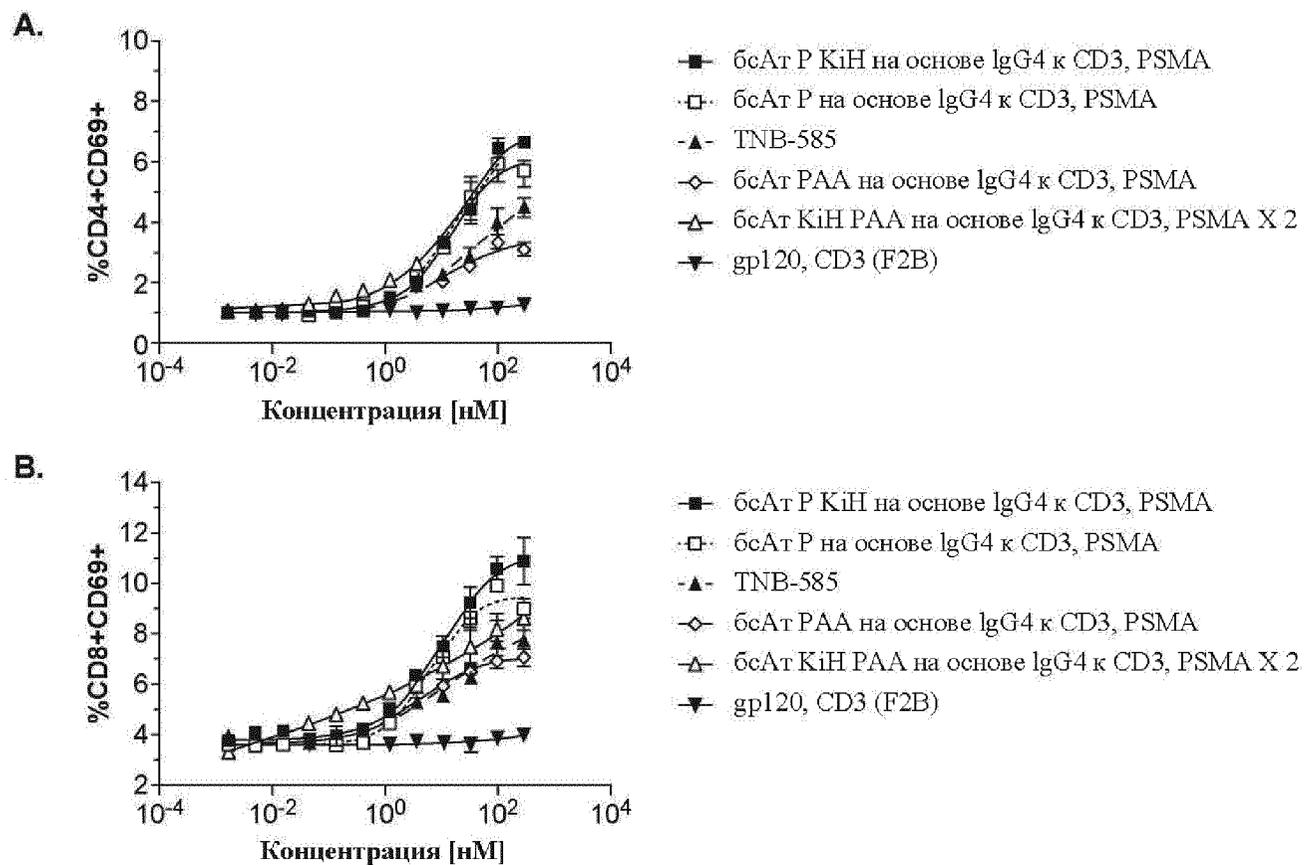
Фиг. 28



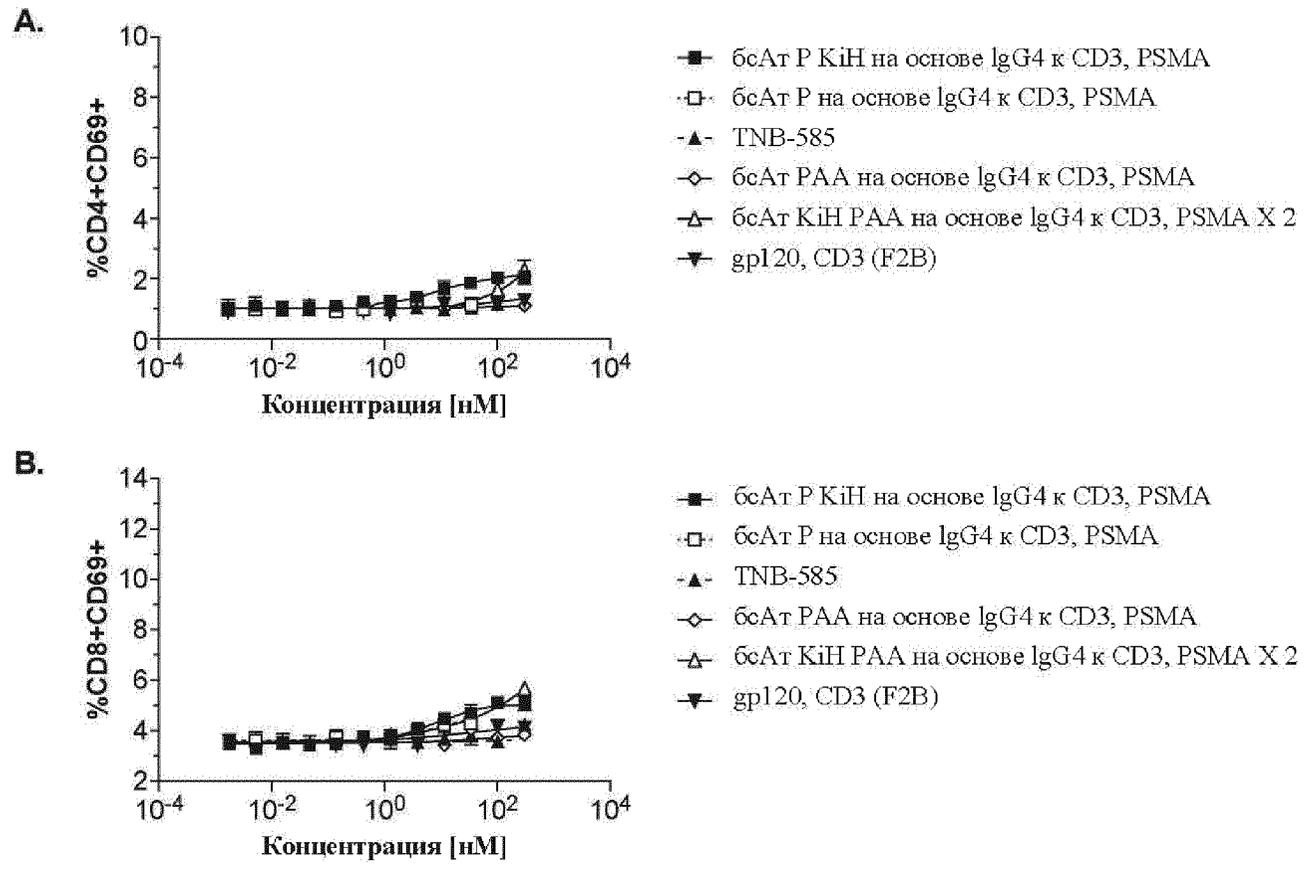
Фиг. 29



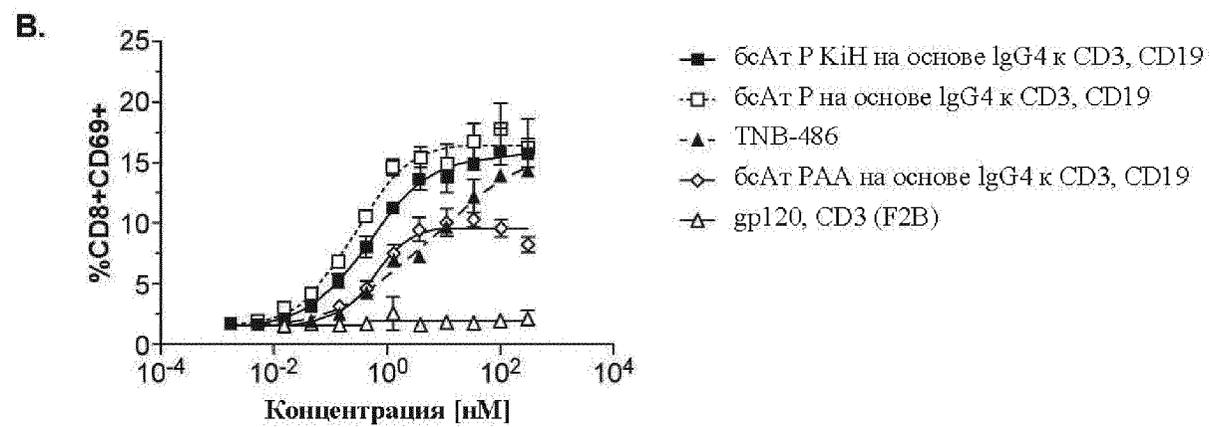
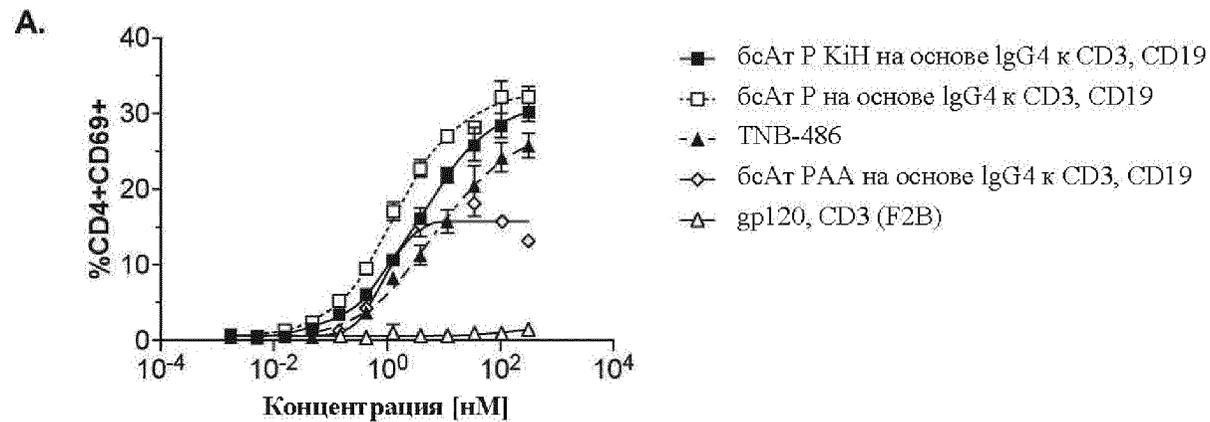
Фиг. 30



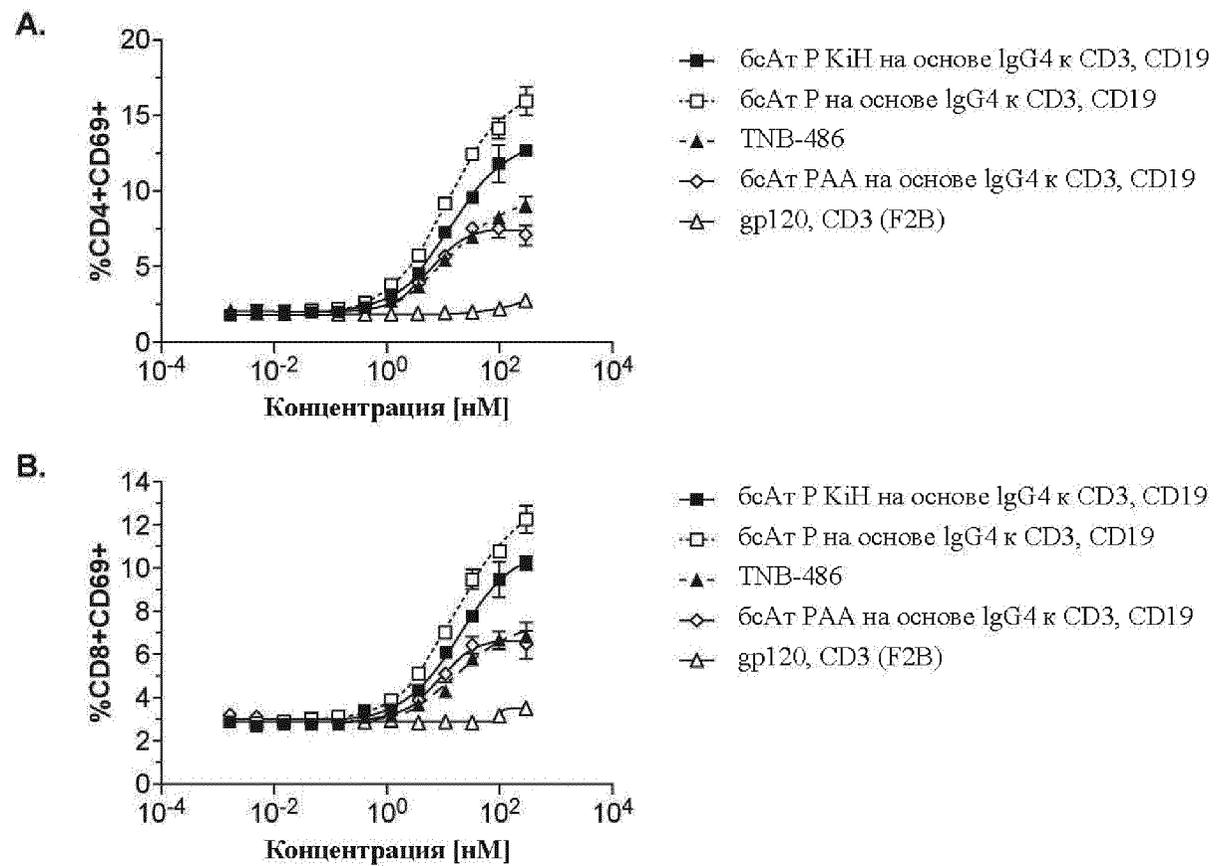
Фиг. 31



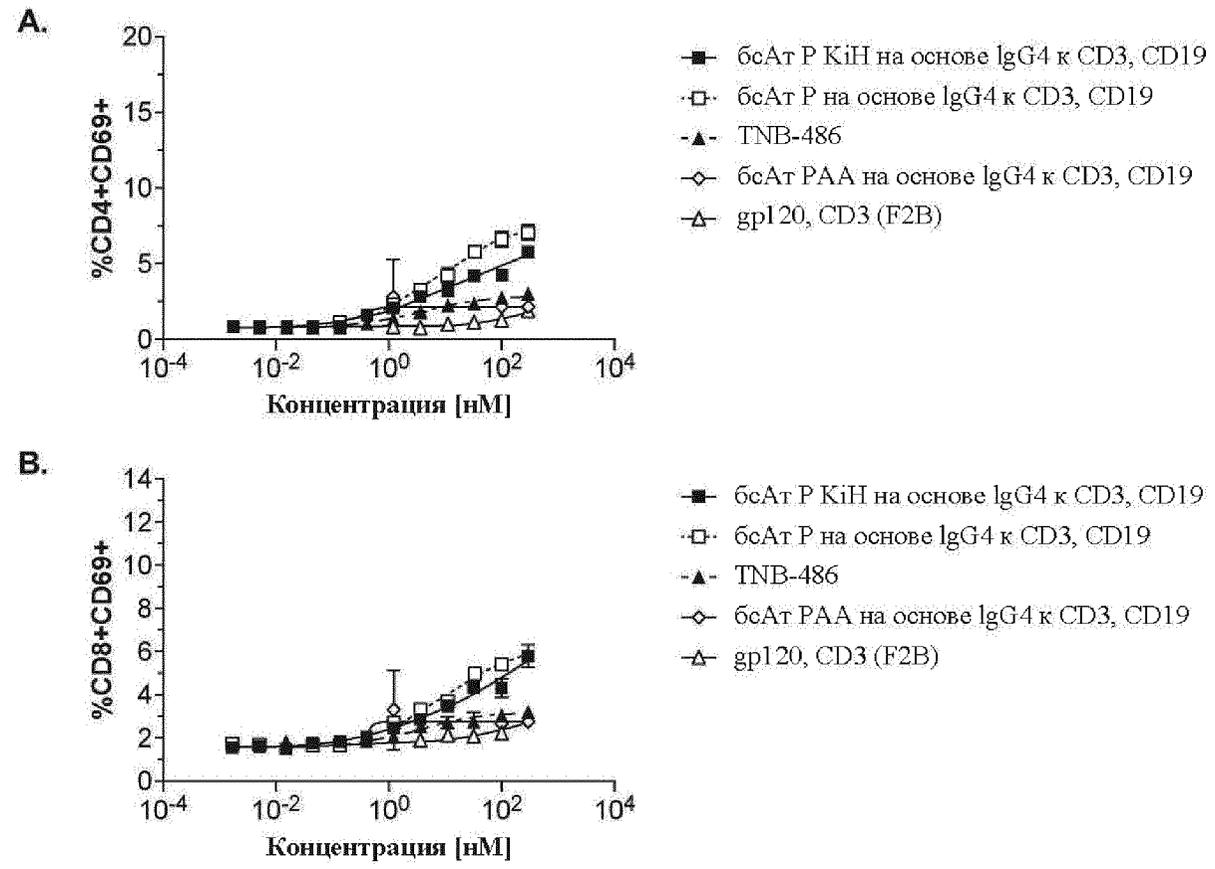
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35