



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.30

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.15

(54) ТРИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА, GPRC5D И CD3

(31) 63/149,921

(32) 2021.02.16

(33) US

(86) PCT/EP2022/053651

(87) WO 2022/175255 2022.08.25

(88) 2022.09.29

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

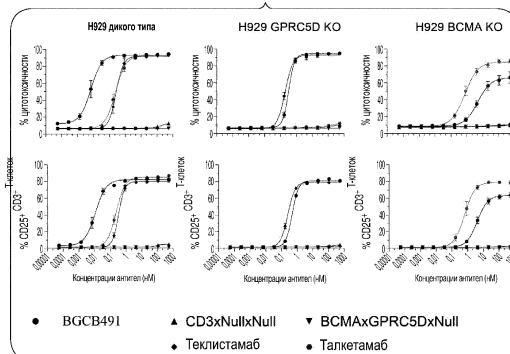
(72) Изобретатель:

Аттар Рикардо Маркос, Бродёр Скотт
Роналд, Ганешан Раджжумар, Луистро
Леопольдо (US), Филиппар Ульрике
(BE), Пилларисетти Кодандарам,
Сингх Санджая, Ян Данылиньдандин
(US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В настоящем документе предлагаются мультиспецифические антитела, которые связываются с ВСМА, GPRC5D и CD3, а также их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифические антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы получения и применения предложенных мультиспецифических антител и мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов. В настоящем документе также предлагаются антитела, которые связываются с ВСМА, и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны способы получения и применения предложенных ВСМА-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов.



ТРИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА, GPRC5D И CD3

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/149,921, поданной 16 февраля 2021 г. Полное содержание упомянутой выше заявки полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

10

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антителам, которые связывают антиген созревания В-клеток (ВСМА), рецептор, сопряженный с G-белком, класс C, группа 5, член D (GPRC5D), а также кластерный детерминант 3 (CD3),
15 моноклональным антителам, которые связывают ВСМА, и способам получения и применения описанных антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Множественная миелома (ММ) представляет собой вторую по
20 распространенности гематологическую злокачественную опухоль и составляет 2% от всех случаев смерти от рака. ММ представляет собой гетерогенное заболевание и вызывается чаще всего транслокациями хромосом, среди прочего, t(11; 14), t(4; 14), t(8; 14), del(13), del(17) (Drach et al., (1998) Blood 92(3):802–809; Gertz et al., (2005) Blood 106(8):2837–2840; Facon et al., (2001) Blood 97(6): 1566–1571). У пациентов с ММ
25 могут возникать различные связанные с заболеванием симптомы по причине инфильтрации костного мозга, деструкцией кости, почечной недостаточности, иммунодефицита и психологического давления в связи с диагнозом рака. По состоянию на 2006 г. 5-летняя выживаемость при ММ составляла приблизительно 34%, и это указывает на то, что ММ является трудноизлечимым заболеванием, которое в
30 настоящее время не лечится.

Антиген созревания В-клеток, также известный как ВСМА, CD269, TNFRSF17 (UniProt Q02223), является представителем надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, который предпочтительно экспрессируется в дифференцированных плазмócитах [Laabi et al. (1992) EMBO J 11(11):3897–3904; Madry et al. (1998) Int

Immunol 10(11):1693–1702]. BCMA представляет собой негликозилированный трансмембранный белок I типа, который участвует в созревании, росте и выживании В-клеток. BCMA является рецептором для двух лигандов надсемейства TNF: APRIL (индуцирующий пролиферацию лиганд, CD256, TNFSF13), лиганд с высоким сродством к BCMA, и фактор активации В-клеток BAFF (THANK, BlyS, стимулятор В-лимфоцитов, TALL-1 и zTNF4), лиганд с низким сродством к BCMA. APRIL и BAFF демонстрируют структурную схожесть и имеют перекрывающиеся участки, но обладают различной специфичностью связывания с рецептором. Кроме того, отрицательный регулятор TACI связывается как с BAFF, так и с APRIL. Связывание посредством координационной связи APRIL и BAFF с BCMA и/или TACI активирует фактор транскрипции NF-κB и увеличивает экспрессию способствующих выживанию членов семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) и уменьшает экспрессию инициирующих апоптоз факторов (например, Bid, Bad, Bik, Bim и т. п.), таким образом ингибируя апоптоз и увеличивая выживаемость. Такое комбинированное действие стимулирует дифференцировку, пролиферацию и жизнеспособность В-клеток и продукцию антител (как описано в обзорной статье Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115–133). BCMA также способствует росту и выживанию злокачественных человеческих В-клеток, включая клетки множественной миеломы (ММ), что согласуется с вышеописанными данными. В соответствии с работой Novak et al. клеточные линии ММ и свежеизолированные клетки ММ экспрессируют BCMA и белок TACI и обеспечивают изменяющуюся экспрессию белка BAFF-R на своих клеточных поверхностях (Novak et al., (2004) Blood 103(2):689–694).

Применение антител к BCMA для лечения лимфом и множественной миеломы упоминается в WO2002066516 и WO2010104949. Антитела к BCMA описаны, например, в публикации Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093–1106, WO200124811 и WO200124812. Тем не менее, несмотря на тот факт, что BCMA, BAFF-R и TACI, т. е. В-клеточные рецепторы, принадлежащие к надсемейству рецепторов TNF, и их лиганды BAFF и APRIL подвергаются воздействию терапии, направленной на борьбу с раком, сохраняется необходимость в дополнительных вариантах лечения таких медицинских состояний.

Сопряженный с G-белком рецептор, класс C, группа 5, член D (GPCR5D) — это сиротский, атипичный GPCR класса C, впервые идентифицированный в 2001 г. (Bräuner-Osborne et al. Biochim Biophys Acta. 1518(3):237-248, 2001). GPCR5D и другие

GPCR группы 5 имеют необычно короткие аминотерминальные домены для рецепторов класса C и, следовательно, предсказуемо являются конформационно аналогичными рецепторам класса A. В этом отношении они уникальны, имея гомологию последовательности к GPCR класса C и прогнозируемую структурную топологию, сравнимую с рецепторами класса A. Функциональные последствия активации GPRC5D описаны не были, и лиганд остается неизвестным. Ген имеет три экзона и расположен на хромосоме 12p13.3 у людей. Рецептор GPRC5D является высококонсервативным среди различных видов и имеет 92% идентичность с GPRC5D яванского макака.

Применение антител к GPRC5D для лечения множественной миеломы упоминается в WO2016090329, WO2018017786, WO2018147245 и WO2019154890. Тем не менее, несмотря на то, что GPRC5D подвергается воздействию терапии, направленной на борьбу с раком, сохраняется необходимость в дополнительных вариантах лечения таких медицинских состояний.

мРНК GPRC5D преимущественно экспрессируется во всех злокачественных плазматических клетках, полученных от пациентов с ММ (Atamaniuk JA et al. Eur J Clin Invest 42(9) 953–960; 2012; Frigyesi-blood and Cohen, et al. Hematology 18(6): 348-35; 2013). Экспрессия GPRC5D различается среди пациентов и хорошо коррелирует с нагрузкой плазматических клеток и генетическими абберациями, такими как делеция Rb-1 (Atamaniuk JA et al. Eur J Clin Invest 42(9) 953–960; 2012).

Клональное сопротивление представляет собой общий механизм рецидивирующей рефрактерной миеломы. Нацеливание на более чем один опухолевый антиген миеломы и взаимодействие Т-клеток могут приводить к эффективному уничтожению злокачественных плазматических клеток и негативному статусу минимального остаточного заболевания (MRD). Двойное нацеливание на BCMA и GPRC5D повышает avidность и эффективность антител, обеспечивает максимальную эрадикацию опухоли в присутствии гетерогенной клеточной популяции, предотвращает выход опухолевого антигена (например, захватывает клетки ММ, не экспрессирующие достаточное количество BCMA или GPRC5D), повышает эффективность лечения опухолей и может снизить вероятность развития синдрома высвобождения цитокинов (CRS). Соответственно, существует потребность в терапевтических антителах, которые нацелены как на BCMA, так и на GPRC5D для лечения множественной миеломы и/или связанных медицинских состояний.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в настоящем документе предлагаются мультиспецифические антитела, которые связываются или специфически связываются с bсma, GPRC5D и CD3, а также их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются триспецифические антитела, которые связываются или специфически связываются с bсma, GPRC5D и CD3, а также их триспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифические антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы применения предложенных мультиспецифических антител. Например, мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 и мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для лечения рака (например, рака с экспрессией BCMA и/или GPRC5D); мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регресса или стабильности течения рака с экспрессией BCMA и/или GPRC5D; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком с экспрессией BCMA и/или GPRC5D, и, следовательно, ответит ли он на лечение BCMA и/или GPRC5D-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к BCMA x GPRC5D x CD3, описанными в настоящем документе.

Мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3

В настоящем документе описаны выделенные мультиспецифические антитела, связывающиеся с BCMA, GPRC5D и CD3 («мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3») и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты.

В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой триспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления выделенное триспецифическое антитело BCMA x GPRC5D x CD3 или его триспецифический связывающий фрагмент содержит: (a) первое

антигенсвязывающее плечо, содержащее первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1); (а) второе

антигенсвязывающее плечо, содержащее второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2); и (с) третье

5 антигенсвязывающее плечо, содержащее третий переменный домен тяжелой цепи (VH3) и третий переменный домен легкой цепи (VL3). В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на CD3, второе антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на GPRC5D, а третье антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на BCMA.

10 В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо триспецифического антитела или его триспецифического связывающего фрагмента содержит первый участок тяжелой цепи (HC1), содержащий VH1, и участок легкой цепи, содержащий VL1. VH1 и VL1 образуют первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген. Второе антигенсвязывающее плечо

15 триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента содержит второй участок тяжелой цепи (HC2), содержащий VH2. VH2 из HC2 образует второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген. HC1 или HC2 дополнительно соединяют с третьим антигенсвязывающим плечом, содержащим VH3, с образованием третьего антигенсвязывающего домена, который связывает третий

20 антиген. Каждый из HC1 и HC2 необязательно содержит домен кристаллизующегося фрагмента (Fc), где домен Fc содержит константную область тяжелой цепи 2 (CH2) и CH3. В некоторых вариантах осуществления первый антиген представляет собой кластер дифференцировки 3 (CD3), а второй антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA), а третий антиген представляет собой член D группы 5

25 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPRC5D). В некоторых вариантах осуществления первый антиген представляет собой кластер дифференцировки 3 (CD3), а второй антиген представляет собой член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPRC5D), а третий антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA). Некоторые аспекты триспецифического антитела BCMA x GPRC5D
30 x CD3 или его триспецифического связывающего фрагмента дополнительно описаны в разделах «Подробное описание» и «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA человека, но не связывается с BCMA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с эпитопом,

включающим один или более остатков из внеклеточного домена (ECD) BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо (или «BCMA-специфическое плечо») мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 получено из антитела к BCMA, описанного в настоящем документе (например, из антитела, имеющего последовательности CDR, перечисленные в таблице 1).

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфическое плечо мультиспецифического антитела связывает человеческий GPRC5D, но не связывается с GPRC5D яванского макака. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфическое плечо мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающих фрагментов связывается с внеклеточным доменом GPRC5D человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо (или «GPRC5D-специфическое плечо») мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 получено из антитела к GPRC5D, описанного в настоящем документе (например, из антитела, имеющего последовательности CDR, перечисленные в таблице 2).

Перенаправление Т-лимфоцитов к клеткам MM, экспрессирующим BCMA и/или GPRC5D, посредством комплекса TCR/CD3 представляет собой привлекательный альтернативный подход. Комплекс TCR/CD3 Т-лимфоцитов состоит из гетеродимера TCR альфа (α)/бета (β) или TCR гамма (γ)/дельта (δ), экспрессируемого на клеточной поверхности совместно с инвариантными субъединицами CD3, обозначаемыми как гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), зета (ζ) и эта (η). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические антитела или мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, связываются с CD3 ϵ . В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо (или «CD3-специфическое плечо») мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 получено из моноклонального антитела CD3B376. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо (или «CD3-специфическое плечо») мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 получено из моноклонального антитела SP34, мышинового изотипа IgG3/лямбда. (K.R. Abhinandan and A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839). В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи, описанные в таблице 3, или любой один домен VH и/или любой один домен VL, выбранный из таблицы 3.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-, GPRC5D- и/или CD3-специфические плечи мультиспецифических антител к ВСМА x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающих фрагментов представляют собой IgG или его производные. Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 5 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами 10 (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc 15 эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с 20 активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую 25 одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa, (c) сниженной аффинностью к FcγRI (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb, (f) сниженной аффинностью к FcγRIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

30 В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которых получено CD3-специфическое плечо

мультиспецифического антитела, представляет собой IgG1 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG1, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит в области Fc замены L234A, L235A и D265S. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которых получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG4 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG4, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит в области Fc замены S228P, L234A, L235A, F405L и R409K. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, связывает CD3ε на первичных человеческих Т-клетках и/или первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, активирует первичные человеческие Т-клетки CD4⁺ и/или первичные Т-клетки CD4⁺ яванского макака.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к BCMA x GPRC5D x CD3 также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3. В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий одну или более CDR варибельного домена тяжелой цепи и/или одну или более CDR варибельного домена легкой цепи каждого антигенсвязывающего плеча триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или триспецифического связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий один или более варибельных доменов тяжелой цепи и/или один или более варибельных доменов легкой цепи триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или триспецифического связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий одну или более полипептидных цепей первого, второго и/или третьего антигенсвязывающего плеча триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или триспецифического связывающего фрагмента. В настоящем документе также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3. В другом

варианте осуществления предлагается выделенная клетка, экспрессирующая мультиспецифическое антитело или мультиспецифический связывающий фрагмент. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293, 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, *E. coli*). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы получения триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или триспецифического связывающего фрагмента путем культивирования клеток.

В настоящем документе также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель.

Способы применения мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3

Кроме того, описаны способы применения описанных мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3 или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов. Например, мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией BCMA и/или GPRC5D у нуждающегося в таком лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой лимфому, такую как множественная миелома, включая тлеющую множественную миелому (SMM). В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы.

Описанные способы лечения рака с экспрессией BCMA и/или GPRC5D у нуждающегося в таком лечении субъекта включают введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или его мультиспецифического антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В предпочтительных вариантах осуществления предлагаются способы лечения субъекта, пораженного раком, путем введения терапевтически эффективного количества триспецифического антитела к BCMA x

GPRC5D x CD3 или триспецифического антигенсвязывающего фрагмента
нуждающемуся в таком лечении пациенту в течение периода времени, достаточного
для лечения рака.

5 Дополнительно в настоящем документе предлагаются способы ингибирования
роста или пролиферации раковых клеток путем введения терапевтически эффективного
количества триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или
триспецифического связывающего фрагмента для ингибирования роста или
пролиферации раковых клеток.

10 В настоящем документе также предлагаются способы перенаправления Т-клетки
к раковой клетке, экспрессирующей GPRC5D и/или BCMA, путем введения
терапевтически эффективного количества триспецифического антитела к BCMA x
GPRC5D x CD3 или триспецифического связывающего фрагмента для перенаправления
Т-клетки к раковому очагу.

15 Специалисту в данной области будет понятно, что способы применения
описанных мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3 и их
мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов могут быть указаны в формате
медицинского применения, например в форме мультиспецифических антител к BCMA
x GPRC5D x CD3 и мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов для
20 применения в лечении заболевания в соответствии с данным документом, в частности
рака. Специалисту в данной области также будет понятно, что способы применения
описанных мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3 и их
мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов могут быть указаны в так
называемой Swiss-модели, например в форме применения мультиспецифических
антител к BCMA x GPRC5D x CD3 и мультиспецифических антигенсвязывающих
25 фрагментов для получения лекарственного средства для лечения заболевания в
соответствии с данным документом, в частности рака. Это касается всего настоящего
описания.

Наборы BCMA x GPRC5D x CD3-специфических антител

30 В настоящем документе описаны наборы, содержащие описанные
мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3. Описанные наборы можно
использовать для осуществления способов применения мультиспецифических антител
к BCMA x GPRC5D x CD3, предложенных в настоящем документе, или других
способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах

осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для лечения рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA. Соответственно, описанные наборы могут включать в себя одно или более мультиспецифических антител или их мультиспецифических

антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, и/или инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

BCMA-специфические антитела

В настоящем документе также предлагаются антитела, которые связываются с BCMA, и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы применения предложенных антител и антигенсвязывающих фрагментов. Например, BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для лечения рака (например, рака с экспрессией BCMA); BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регресса или стабильности течения рака, экспрессирующего BCMA; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком с экспрессией BCMA, и, следовательно, ответит ли он на лечение BCMA-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к BCMA и CD3, описанными в настоящем документе. Некоторые аспекты BCMA-специфического антитела или антигенсвязывающего фрагмента дополнительно описаны в разделах «Подробное описание» и «Примеры» ниже.

Способы применения BCMA-специфических антител

Кроме того, описаны способы применения описанных BCMA-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Конкретные антитела для применения в способах, описанных в данном разделе, включают те, что имеют набор CDR,

описанный для антител в таблице 1 (например, ВСМВ519). Например, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться при лечении рака путем блокировки взаимодействий с рецептором ВСМА или, там где антитело конъюгируют с токсином, направляя токсин к раку, экспрессирующему ВСМА. Кроме того, данные

5 антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для обнаружения наличия ВСМА в биологической пробе, например в крови или сыворотке; для количественного определения ВСМА в биологической пробе, например в крови или сыворотке; для диагностики рака, экспрессирующего ВСМА; определения способа лечения субъекта, пораженного раком; или контроля прогрессирования рака,

10 экспрессирующего ВСМА, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА может представлять собой лимфому, такую как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM). В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая

15 или рефрактерная форма множественной миеломы. Описанные способы можно осуществлять до того, как субъект получит лечение по поводу рака, экспрессирующего ВСМА, например лечение мультиспецифическим антителом к ВСМА и CD3. Кроме того, описанные способы можно осуществлять после того, как субъект получит лечение по поводу рака, экспрессирующего ВСМА, например лечение мультиспецифическим

20 антителом к ВСМА и CD3, описанным в настоящем документе.

Описанные способы обнаружения ВСМА в биологической пробе включают воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

Описанные способы диагностирования рака, экспрессирующего ВСМА, у

25 субъекта также включают воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; однако способы также включают определение количества ВСМА, присутствующего в пробе; сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с известной стандартной или эталонной пробой; и определение того, попадают

30 ли уровни ВСМА субъекта в пределы уровней ВСМА, связанных с раком.

В настоящем документе также описаны способы контроля рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта. Описанные способы включают воздействие на биологическую пробу одним или более из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; определение

количества ВСМА, присутствующего в пробе, при связывании с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, либо с известной стандартной или эталонной пробой, либо с количеством ВСМА в подобной пробе, полученной от субъекта ранее; и определение того, являются ли уровни ВСМА у субъекта показателями прогрессирования, обратного развития или стабильного течения заболевания на основании разницы количества ВСМА в сравниваемых пробах.

Пробы, полученные от субъектов, представляют собой биологические пробы, например мочу, кровь, сыворотку, плазму, слюну, асцитную жидкость, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки, клетки, не связанные с тканями, ткани, хирургически иссеченную ткань опухоли, материалы биопсии, пробы, полученные с помощью тонкоигльной аспирационной биопсии или гистологические препараты.

Описанные ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно метить для применения описанными способами или другими способами, известными специалистам в данной области. Например, антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпитопной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусной кислотой (DTPA), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и бета-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными в данной области.

Наборы ВСМА-специфических антител

В настоящем документе описаны наборы, включающие описанные ВСМА-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении наличия ВСМА в биологической пробе. Соответственно, описанные наборы могут включать одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, инструкции по

применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1А–1Б. Описание триспецифического антитела BGCB463 (ФИГ. 1А) и предполагаемого принципа действия (ФИГ. 1Б).

Фиг. 2А–2Г. BGCB463 (кружки) или отрицательный контроль B23B251 (треугольники) инкубировали с клетками H929 дикого типа (WT) (ФИГ. 2А), H929-GPRC5D нокаутный вариант (КО) (ФИГ. 2Б), H929-BCMA КО (ФИГ. 2В) и H929-GPRC5D/BCMA КО (ФИГ. 2Г) в течение 1 ч при 37 °С при начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью материала, меченного AF647, анализировали сигнал СИФ для получения EC₅₀ и EC₉₀. Кривые отражают данные, полученные в ходе пяти независимых экспериментов. Значения EC₅₀ или EC₉₀ представляют собой средние значения.

Фиг. 3А–3Г. BGCB463 (кружки) или отрицательный контроль B23B251 (треугольники) инкубировали с клетками MM.1R WT (ФИГ. 3А), MM.1R -GPRC5D КО (ФИГ. 3Б), MM.1R -BCMA КО (ФИГ. 3В) и MM.1R -GPRC5D/BCMA КО (ФИГ. 3Г) в течение 1 ч при 37 °С при начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью материала, меченного AF647, анализировали сигнал СИФ для получения EC₅₀ и EC₉₀. Кривые отражают данные, полученные в ходе пяти независимых экспериментов.

Фиг. 4А–4В. BGCB463 (кружки) или отрицательный контроль B23B251 (треугольники) инкубировали с пан-Т-клетками (3 случайных донора, ФИГ. 4А–4В) в течение 1 ч при 37 °С в начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью материала, меченного AF647, анализировали сигнал СИФ для получения EC₅₀ и EC₉₀. Данные являются репрезентативными для двух отдельных прогонов, в каждом из которых использовались три донора.

Фиг. 5А–5В. BGCB463 инкубировали с пан-Т-клетками (3 случайных донора, ФИГ. 5А, ФИГ. 5Б и ФИГ. 5В) в течение 1 ч при 4 °С (кружки) или 37 °С (треугольники) при начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью материала, меченного AF647, анализировали сигнал СИФ для получения EC₅₀.

Фиг. 6А–6В. Клетки BGCB463.003 (кружки), BGCB463.004 (квадраты) и отрицательный контроль B23B251 (треугольники) тестировали с клетками H929 (ФИГ. 6А), MM.1R (ФИГ. 6Б) и пан-Т (ФИГ. 6В) от 3 доноров. Молекулы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С при начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью материала, меченного AF647, анализировали сигнал СИФ.

Фиг. 7А–7Г. Клетки H929 (ФИГ. 7А), H929-GPRC5D КО (ФИГ. 7Б), H929-BCMA КО (ФИГ. 7В) и H929-GPRC5D/BCMA КО (ФИГ. 7Г) инкубировали в течение 1 ч, 3 ч, 5 ч и 24 ч при трех оптимизированных концентрациях BGCB463 при 37 °С. Затем клетки промывали и инкубировали в течение 30 мин на льду с антителом к IgG человека AF647. Прочтение представляет собой СИФ сигнала AF647.

Фиг. 8А–8Г. Клетки MM.1R WT (ФИГ. 8А), MM.1R -GPRC5D КО (ФИГ. 8Б), MM.1R -BCMA КО (ФИГ. 8В) и MM.1R -GPRC5D/BCMA КО (ФИГ. 8Г) инкубировали в течение 1 ч, 3 ч, 5 ч и 24 ч при трех оптимизированных концентрациях BGCB463 при 37 °С. Затем клетки промывали и инкубировали в течение 30 мин на льду с антителом к IgG человека AF647. Прочтение представляет собой СИФ сигнала AF647.

ФИГ. 9А–Д. BGCB463 (кружки) или отрицательный контроль B23B251 (треугольники) инкубировали с клетками K562, экспрессирующими GPRC5D человека (ФИГ. 9А), BCMA человека (ФИГ. 9Б), GPRC5D яванского макака (ФИГ. 9В) или BCMA яванского макака (ФИГ. 9Г) в течение 1 ч при 37 °С в начальной концентрации 2 мкМ. После вторичного обнаружения с помощью антитела к IgG человека AF647, анализировали сигнал СИФ получения EC₅₀ и EC₉₀ (ФИГ. 9Д). Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов.

Фиг. 10А–10Б. BGCB463 (кружки) или отрицательный контроль B23B251 (треугольники) в начальной концентрации 10 нМ инкубировали с клетками K562, экспрессирующими GPRC5D человека или яванского макака, или 100 нМ для K562, экспрессирующих BCMA человека/яванского макака, в качестве клеток-мишеней. Активация и цитотоксичность для варианта человека представлены на ФИГ. 10А. Активация и цитотоксичность для варианта яванского макака представлены на ФИГ. 10Б. Пан-Т-клетки человека (1 донор) добавляли в соотношении эффектор-мишень (Е : Т) 3 : 1 и инкубировали в течение 72 ч при 37 °С. Цитотоксичность определяли с использованием фиксирующего красителя живых/мертвых клеток, а CD25 измеряли с использованием конъюгированных с BV421 антител к CD25.

ФИГ. 11. Клетки H929 инкубировали с возрастающей концентрацией BGCB463 или отрицательным контролем B23B251 в течение 1 ч при 37 °C с антителом к IgG человека AF647 в присутствии среды (RPMI, содержащей 10% FBS) или RPMI, содержащей 90% сыворотки человека. Связывание BGCB463 не зависит от наличия сыворотки.

ФИГ. 12. Т-клетки инкубировали с возрастающей концентрацией BGCB463 или отрицательным контролем B23B251 в течение 1 ч при 37 °C с антителом к IgG человека AF647 в присутствии среды (RPMI, содержащей 10% FBS) или RPMI, содержащей 90% сыворотки человека. Данные являются репрезентативными для трех доноров, протестированных в двух экспериментах. Связывание BGCB463 не зависит от наличия сыворотки.

Фиг. 13А–13Б. Клетки H929-GFP инкубировали с BGCB463 и человеческими пан-Т-клетками от 3 доноров в соотношении Е : Т 3 : 1 с добавлением антитела к CD25 AF647 для отслеживания активации Т-клеток (ФИГ. 13А). Процент цитолиза рассчитывали на основе сигнала GFP в обработанных по сравнению с необработанными лунках (ФИГ. 13Б). Инкубация продолжалась приблизительно 140 часов с получением изображений каждые три часа.

Фиг. 14А–14Е. Клетки H929-GFP инкубировали с молекулами BGCB463 или B23B251 (изотипический контроль) и человеческими пан-Т-клетками от четырех доноров в соотношении Е : Т 1 : 1 и 5 : 1 с добавлением антитела к CD25 AF647 для отслеживания активации Т-клеток. Процент цитолиза рассчитывали на основе сигнала GFP в обработанных по сравнению с необработанными лунках. Инкубация продолжалась приблизительно 140 часов с получением изображений каждые три часа. BGCB463, соотношение 1 : 1, цитолиз (ФИГ. 14А). BGCB463, соотношение 1 : 1, общая интегральная интенсивность (ФИГ. 14Б). BGCB463, соотношение 5 : 1, цитолиз (ФИГ. 14С). BGCB463, соотношение 5 : 1, общая интегральная интенсивность (ФИГ. 14Г). B23B251, соотношение 5 : 1, цитолиз (ФИГ. 14Е). B23B251, соотношение 5 : 1, общая интегральная интенсивность (ФИГ. 14Е).

Фиг. 15А–15Г. Определение интерференции растворимых ВСМА с использованием сывороток пациента. Донор 1 (ФИГ. 15А); Донор 2 (ФИГ. 15Б); Донор 3 (ФИГ. 15В); и нормальная сыворотка (ФИГ. 15Г). Сыворотки пациентов с известным уровнем sBCMA инкубировали (90% сыворотки к 10% среды) с непосредственно мечеными BGCB463-AF647 и изотипическим контролем B23B251-AF647 в течение 1 ч при 37 °C на клетках H929. 50% и 10% сыворотки пациента

разводили нормальной сывороткой до конечной концентрации 50% и 10% соответственно.

ФИГ. 16. Описание триспецифического антитела BGCB491.

Фиг. 17А–17Б. BGCB463, BGCB491 и три контроля (BGCB482 (CD3xNullxNull), BGCB483 (CD3xNullxBCMA), BGCB484 (CD3xGPRC5DxNull)) тестировали против BCMA⁺ GPRC5D⁺ клеток (ФИГ. 17А) и BCMA⁺ GPRC5D⁺ клеток (ФИГ. 17Б). Соотношение эффектора к мишени (Е : Т) составляло 3 : 1; n = 1 доноров Т-клеток, инкубация 72 часа, максимальная концентрация 53 нМ, разведение 1–5. Испытания проводили для оценки как цитотоксичности, так и активации Т-клеток.

Фиг. 18А–18Б. BGCB463 и BGCB491 истощали клеточные линии H929 WT, GPRC5D KO и BCMA KO через 72 и через 96 часов после первичной инкубации (ФИГ. 18А). Соотношение Е : Т составляло 3 : 1, n = 5 доноров Т-клеток; инкубация 72 (5) и 96 (4) часов; максимальная концентрация 532 нМ, градиент разведения 1–5. Оба антитела демонстрируют повышенную активацию Т-клеток как через 72, так и через 96 часов в тех же клетках H929 WT, GPRC5D KO и BCMA KO, как описано выше (ФИГ. 18Б).

ФИГ. 19. BGCB463 и BGCB491 были протестированы в анализах цитотоксичности и активации Т-клеток на линиях клеток H929, RAMOS и GRANTA-519. Соотношение Е : Т составляло 5 : 1, n = 1 доноров Т-клеток; инкубация только 72 часа; максимальная концентрация 53 нМ; и разведение 1–5.

ФИГ. 20. BGCB463 и BGCB491 были протестированы в анализах цитотоксичности и активации Т-клеток цельной крови с клетками H929. Соотношение Е : Т составляло 5 : 1, n = 2 доноров цельной крови; инкубация 48 часов; максимальная концентрация 532 нМ; и разведение 1–5.

Фиг. 21А–21Б. Было показано, что BGCB463 подавляет рост опухоли в моделях с ксенотрансплантатами у мышей MM.1S и RPMI 8226 при введении достаточно высокой дозы: 2 мкг или 10 мкг в модели MM.1S (ФИГ. 21А) или 5 мкг или 10 мкг в модели RPMI 8226 (ФИГ. 21Б).

ФИГ. 22. Было показано, что BGCB463 и BGCB491 подавляют рост опухоли в профилактических моделях с ксенотрансплантатами у мышей H929. По сравнению с PBS-контролем дозы 0,5 мкг и 5 мкг замедляли рост опухоли как в модели H929-BCMA KO, так и в модели H929-GPRC5D KO, причем более высокая концентрация 5 мкг давала больший эффект.

ФИГ. 23. BGCB463 и BGCB491 исследовали в течение 1 ч, при 37 °С путем анализа кривой доза-ответ связывания с пан-Т-клетками. Использовали человеческие пан-Т-клетки от двух доноров, начальные концентрации тестируемых молекул составляли 2 мкМ при разведении 1 : 3 и 11-точечной кривой доза-ответ.

5 **ФИГ. 24А–24Г.** BGCB463, BGCB491 и нулевой контроль были протестированы против клеток H929 WT (ФИГ. 24А), H929-BCMA КО (ФИГ. 24Б), H929-GPRC5D КО (ФИГ. 24В) и H929-BCMA/GPRC5D двойной КО (ФИГ. 24Г) путем анализа кривой доза-ответ связывания набора в течение 1 часа при 37 °С.

10 **ФИГ. 25.** Типичные профили связывания BGCB491 на клетках H929 WT, H929-BCMA КО, H929-GPRC5D КО и/или H929-BCMA/GPRC5D двойной КО после 1 часа инкубации при 37 °С. BGCB491 обозначен ●, а отрицательный контроль CD3xNullxNull BGCB510 обозначен ■. Кривые являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов. Клон H929-GPRC5D-КО H15 представляет собой гетерозиготную нокаутную линию с 2 копиями гена с распределением 30% и 61%. Клон J929-BCMA-
15 КО J8 представляет собой гетерозиготную нокаутную линию с 2 копиями гена с равным распределением 50%.

ФИГ. 26. Профили связывания первичных Т-клеток с BGCB491 на 7 препаратах донорских клеток после 1 часа инкубации при 37 °С. СИФ —средняя интенсивность флуоресценции.

20 **ФИГ. 27.** Репрезентативная экстраполяция биоинформатической кривой связывания с антителом к CD3B376xNull (GCDB381).

ФИГ. 28А–28Б. BGCB491-опосредованная (ФИГ. 28А) клеточная цитотоксичность и (ФИГ. 28Б) Т-клеточная активация BCMA-GPRC5D-двойных положительных и BCMA-GPRC5D-двойных отрицательных клеточных линий.
25 BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) в присутствии пан-Т-клеток от 6 здоровых доноров (ID доноров: 20063323, 20063309, 20062062, 20063310, 20062105 и 20061963) и Fc-блокатора (2 мг/мл) и инкубировали в течение 72 часов. В данных исследованиях было протестировано оптимальное соотношение Е : Т 3 : 1 (для оценки
30 отношения Е : Т см. ФИГ. 33А–33Б). Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между Т-клеточными донорами (построены графики по средним значениям 6 доноров). На ФИГ. 28А гибель клеток-мишеней

измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности на оси Y. На ФИГ. 28Б активацию Т-клеток измеряли как процент CD25+ CD3+ Т-клеток.

ФИГ. 29. BGCB491-опосредованная цитотоксичность клональных клеток H929 CRISPR KO и Т-клеточная активация. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) в присутствии пан-Т-клеток от 4 здоровых доноров (ID доноров: 20063323, 20063309, 20062062 и 20063310) и Fc-блокатора (2 мг/мл) и инкубировали в течение 72 часов. В данных исследованиях тестировали соотношение E : T 3 : 1. Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между Т-клеточными донорами (построены графики по средним значениям 4 доноров). Гибель клеток-мишеней измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности в верхнем ряду и активации Т-клеток, измеряемой как процент CD3+ положительных клеток, экспрессирующих CD25, в нижнем ряду (ось Y).

ФИГ. 30. BGCB491-опосредованная цитотоксичность клеток-мишеней в цельной крови с добавлением клеток MM H929 (MABEL-анализ). MABEL — минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) к цельной крови от 7 здоровых доноров (ID доноров: 10145, 10403, 10420, 10083, 10463, 10493 и 10145; источник Т-клеток) в присутствии клеток-мишеней миеломы H929 при скорректированном соотношении E : T 5 : 1 в течение 48 часов. Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между Т-клеточными донорами (построены графики по средним значениям 7 доноров). Гибель клеток-мишеней измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности и Т-клеточной активации, измеренной как процент CD25+ CD3+ клеток. В этом эксперименте в качестве положительного контроля тестировали теклистамаб и талкетамаб.

ФИГ. 31. Профили цитокинов BGCB491 из анализа MABEL. MSD, Meso Scale Discover. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) к цельной крови от 3 здоровых доноров. Супернатанты клеток H929 из вышеуказанного эксперимента

цитотоксичности (ФИГ. 7; 3 донора Т-клеток; ID донора: 10083, 10463 и 10493) собирали и анализировали на уровни цитокинов с использованием мультиплексного анализа на основе MSD (№ по каталогу: K15049D). Уровни цитокинов измеряли как пг/мл. Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между Т-клеточными донорами (построены графики по средним значениям 3 доноров). В этом эксперименте в качестве положительного контроля тестировали теклистамаб и талкетамаб.

ФИГ. 32. Цитотоксическая активность BGCB491 в отношении человеческих первичных CD138⁺ клеток MM. MNC — мононуклеарная клетка. Замороженные мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга (BM MNC) 4 различных пациентов с миеломой (MM BM MNC-626, 649, 652 и 653), использовали для оценки активности истощения плазматических клеток BGCB491 (верхний ряд) и активации Т-клеток (нижний ряд). Т-клетки от нормального здорового донора (ID донора: 20063309) экзогенно добавляли к образцам BM MNC пациентов (соотношение E : T 1 : 1) и инкубировали с BGCB491, CD3xNullxNull, теклистамабом или талкетамабом (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) в течение 48 часов. Наблюдали уменьшение количества живых плазмоцитов (CD138⁺) и сопутствующее увеличение экспрессии CD25 на Т-клетках в ответ на обработку BGCB491. Между донорами наблюдали вариабельность общего исходного количества плазматических клеток. Приведены значения плотности отдельных целевых рецепторов и процентное содержание целевых рецепторов в популяции.

ФИГ. 33А–33Б. Потенциал цитотоксичности BGCB491 при различных соотношениях E : T и времени инкубации (клеточная линия H929). (ФИГ. 33А) BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull исследовали в присутствии пан-Т-клеток от 1 здорового донора (ID донора: 20063323) при 4 различных соотношениях E : T (5 : 1, 3 : 1, 1 : 1 и 0,5 : 1) в течение 72 часов. (ФИГ. 33Б) BGCB491 исследовали при соотношении E : T 3 : 1 и 1 : 1 в течение различных моментов времени (24 часа — кружок, 48 часов — восходящий треугольник, 72 часа — нисходящий треугольник, 96 часов — шестиугольник, 120 часов — ромб, 144 часа — звезда и 168 часов — квадрат) с использованием 4 различных доноров Т-клеток (ID донора: 20062105, 20063309, 20061963 и 20063310). Показатели гибели клеток-мишеней и Т-клеточной активации измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности и процентного содержания

CD25⁺ CD3⁺ Т-клеток. Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Точки данных вплотную располагались вдоль построенной аппроксимирующей кривой, и наблюдалась слабая вариабельность между донорами Т-клеток: (ФИГ. 33А) 1 и (ФИГ. 33Б) построены графики по средним значениям 4 доноров.

ФИГ. 34А–34В. Влияние BGCB491 на активацию Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней. Анализ активации Т-клеток проводили с использованием (ФИГ. 34А) Т-клеток от 6 нормальных здоровых доноров (ID донора: 20063323, 20063309, 20062062, 20063310, 20062105 и 20061963) или (ФИГ. 34Б) образцов цельной крови от 6 нормальных доноров (ID донора: 10274, 10402, 10427, 10470, 10500 и 10509). (ФИГ. 34В) Неспецифическую цитотоксичность измеряли для различных подмножеств. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,00005 до 533,33 нМ, ось X) в течение 72 часов (ФИГ. 34А) и 48 часов (ФИГ. 34Б, 34В).

ФИГ. 35. Противоопухолевая эффективность BGCB491, теклистамаба и талкетамаба при подкожном (п/к) введении ксенотрансплантатов RPMI 8226 гуманизированным Т-клетками мышам NSG (исследование А). КО — нокаут; NSG — тяжелый комбинированный иммунодефицит (scid) гамма больных диабетом без ожирения (NOD) или NOD.Cg *Prkdc^{scid} Il2rg^{TM1Wjl}/SzJ*; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; SEM — стандартная ошибка среднего значения. Гуманизированным Т-клетками мышам NSG с развившимися подкожными опухолями RPMI8226 вводили внутрибрюшинно (в/б) BGCB491 в дозе 0,1, 0,4, 1 и 2,5 мг/кг. Теклистамаб вводили внутрибрюшинно в дозе 0,4, 1 и 2,5 мг/кг. Талкетамаб вводили внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг. Препараты вводили в дни 19, 21, 25, 28, 31, 34, 38 и 41 (обозначено черной линией под осью X). Объем опухоли измеряли два раза в неделю, а результаты представляли как среднее значение объема опухоли ± SEM для каждой группы. Данные графически представлены для каждой группы, в которой в исследовании осталось по меньшей мере 70% животных.

ФИГ. 36. Противоопухолевая эффективность BGCB491, теклистамаба и талкетамаба при подкожном (п/к) введении ксенотрансплантатов H929-BCMA-КО и H929-GPRC5D-КО гуманизированным Т-клетками мышам NSG (исследование В). КО — нокаут; NSG — тяжелый комбинированный иммунодефицит (scid) гамма больных диабетом без ожирения (NOD) или NOD.Cg *Prkdc^{scid} Il2rg^{TM1Wjl}/SzJ*; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; SEM — стандартная ошибка среднего значения.

Гуманизированным Т-клетками мышам NSG с опухолями H929-BCMA-KO (левый бок) и H929-GPRC5D-KO (правый бок) вводили внутрибрюшинно (в/б) BGCB491 в дозе 0,025, 0,1, 0,25 и 0,5 мг/кг. Теклистамаб и талкетамаб вводили в/б в дозе 0,1 и 0,25 мг/кг. Препараты вводили в дни 1, 5, 9, 13, 16, 19 и 22 (обозначено черной линией под осью X). Объем опухоли измеряли два раза в неделю, а результаты представляли как среднее значение объема опухоли $\pm$ SEM для каждой группы. Данные графически представлены для каждой группы, в которой в исследовании осталось по меньшей мере 70% животных.

ФИГ. 37–38. Индивидуальная концентрации BGCB491 в сыворотке крови — временные профили после однократного внутривенного (в/в) введения дозы 0,5 мг/кг самке яванского макака (ФИГ. 37) и в прогнозной модели (ФИГ. 38). BQL — ниже предела количественного определения. Точки данных с концентрациями ниже наименьшей количественной концентрации не показаны на графике.

ФИГ. 39А–39Б. Средняя (SD) концентрация BGCB491 — временные профили после однократного введения BGCB491 самцам минипига и в прогнозировании на основе модели. BQL — ниже предела количественного определения; CO — стандартное отклонение. Точки данных с концентрациями ниже наименьшей количественной концентрации не показаны на графике. Группа 1. Доза = 0,01 мг/кг, подкожное (п/к) введение. Группа 2. Доза = 0,1 мг/кг, п/к. Группа 3. Доза = 0,1 мг/кг, в/в.

ФИГ. 40. Профили кинетического связывания BGCB463 на линии клеток H929 WT и MM.1R WT в ходе инкубации в течение 24 часов при 37 °C. СИФ — средняя интенсивность флуоресценции.

ФИГ. 41. Связывание BGCB491 с эндогенными линиями клеток, экспрессирующих BCMA-GPRC5D. Геом. — геометрическое. BGCB491, BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull добавляли в различных концентрациях (от 0,096 до 1000 нМ, ось X) и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Графики строили с использованием Prism8 путем аппроксимации отдельных 4PL-моделей к наблюдаемым данным. Значения интенсивности связывания выражали в виде геометрического среднего (ось Y).

ФИГ. 42. Кинетическая цитотоксичность и Т-клеточная активация BGCB491 и CD3B2271 (нулевой контроль) с использованием Т-клеток от 3 доноров Т-клеток в соотношении Е : Т 1 : 1 (ФИГ. 42А) и 1 : 3 (ФИГ. 42Б). Измерение CD25 на приборе Incucyte представляет собой измерение количества Т-клеток и экспрессии CD25 (общая

интегральная интенсивность). CD25 является более поздним маркером активации Т-клеток, обычно обнаруживаемым через 24 часа после активации и достигающим своего пика примерно через 96 часов. Это не обязательно совпадает с цитотоксичностью по времени. Процент цитолиза рассчитывался на основе сигнала зеленого флуоресцентного белка (GFP) в обработанных лунках по сравнению с необработанными.

ФИГ. 43. Процент цитолиза и Т-клеточной активации BGCB491 и CD3B2271 (нулевой контроль) во временных точках 72, 93 и 120 часов при соотношении эффектор/мишень 1 : 1 (Е : Т).

ФИГ. 44. Процент цитолиза и Т-клеточной активации BGCB491 и CD3B2271 (нулевой контроль) во временных точках 72, 93 и 120 часов при соотношении Е : Т 1 : 3.

ФИГ. 45. Противоопухолевая эффективность JNJ-79635322, теклистамаба и талкетамаба при подкожном введении ксенотрансплантатов MM.1S гуманизированным Т-клетками мышам NSG (исследование С). NSG — тяжелый комбинированный иммунодефицит (*scid*) гамма больных диабетом без ожирения (NOD) или NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; SEM — стандартная ошибка среднего значения. Гуманизированным Т-клетками мышам NSG с развившимися подкожными опухолями MM.1S вводили внутрибрюшинно BGCB491 в дозе 0,025, 0,1, 0,5 и 1 мг/кг. Теклистамаб вводили внутрибрюшинно в дозе 0,025 и 0,1 мг/кг. Теклистамаб вводили внутрибрюшинно в дозе 0,1 и 0,5 мг/кг в дни 15, 19, 22, 26, 30, 34 и 37 (обозначено черной линией под осью X). Объем опухоли измеряли два раза в неделю, а результаты представляли как среднее значение объема опухоли ± SEM для каждой группы. Данные графически представлены для каждой группы, в которой в исследовании осталось по меньшей мере 70% животных. Наблюдение за животными после введения проводилось до появления признаков реакции трансплантата против хозяина (GvHD), после чего животные подверглись эвтаназии, и исследование было завершено на 51-й день.

ФИГ. 46А–46Б. Препарат BCMA (BCMB519) демонстрирует сравнимое с теклистамабом связывание и цитотоксичность при идеальных биофизических свойствах scFv.

ФИГ. 47. Препарат GPRC5d (GC5B680) демонстрирует специфическое и улучшенное связывание по сравнению с талкетамабом при идеальных биофизических свойствах scFv.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Определения

5 В настоящем описании и формуле изобретения используют различные термины, относящиеся к аспектам настоящего описания. Такие термины должны иметь обычное для них значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

10 При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

15 В контексте настоящего документа термин «около» при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и т. п., считается охватывающим отклонения до $\pm 10\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации описанных способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и т. п., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около».

20 Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, указанные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом

25 крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

30 Хотя числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин «выделенный» означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. В настоящем документе термин «выделенное» антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые по существу не содержат других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с ВСМА, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от ВСМА). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом ВСМА или GPRC5D, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, от других видов (таких как видовые гомологи ВСМА или GPRC5D).

Термин «полинуклеотид», который является синонимом термину «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями,

модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболитически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Значение термина «по существу такой же» может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, как ожидается, можно встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, которые практически не влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые ощутимо не меняют природу кодируемого белка. Соответственно, в контексте нуклеотидных последовательностей «по существу такой же» означает по меньшей мере 65% идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится к по меньшей мере 70% идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99% или более идентичности. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. % гомологии = кол-во

идентичных положений / общее кол-во положений x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с

- 5 помощью алгоритма, описанного в публикации E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11–17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков РАМ120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм, описанный в публикации Needleman and
10 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444–453 (1970).

- Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно, в контексте
15 антитела или антигенсвязывающего фрагмента «по существу такой же» относится к антителу или антигенсвязывающим фрагментам, имеющим 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, остов или
20 другие несвязывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с
25 последовательностями, описанными в настоящем документе.

- Под термином «клон» понимается популяция клеток, полученная из одной клетки или общего предшественника путем митоза. Под термином «клеточная линия» понимается клон первичной клетки, способный к стабильному росту *in vitro* в течение многих поколений. В некоторых примерах, представленных в настоящем документе,
30 клетки трансформируют путем трансфицирования в них ДНК.

Термины «экспрессирует» и «продуцирует» используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все

посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток.

- 5 Термин «лечение» относится к любому успеху или признаку успеха в ослаблении или облегчении симптомов травмы, патологии или состояния, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как ослабление боли, ремиссия, ослабление симптомов или перевод состояния в легче переносимую
- 10 пациентом форму, замедление скорости развития дегенеративных изменений или угасания функции, перевод конечной точки дегенеративных изменений в менее угнетающую пациента форму, улучшение общего физического или умственного состояния пациента или продление выживаемости. Лечение можно оценивать по объективным или субъективным параметрам, включая результаты объективного
- 15 обследования, неврологического осмотра или психиатрической экспертизы.
- 15 Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела к ВСМА x GPRC5D x CD3 может
- 20 меняться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела пациента и от способности антитела вызывать желаемый ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела
- 25 перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

- 25 «Антителом» называются все изотипы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин «антитело» охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

- 30 Термин «антигенсвязывающее плечо» относится к части антитела, которая включает антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном (например, ВСМА, GPRC5D или CD3), и необязательно включает одну или более других областей антитела (например, домен Fc).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антигенсвязывающего плеча, содержащего антигенсвязывающий домен.

Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением, пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность

5 исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (переменную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают в себя, без ограничений, диатела и

10 одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент,

15 состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544–546 (1989)),

20 который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov.; 21(11):484–90); антитело верблюжьего типа (камелид) или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1):111-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и т. п.; и триспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Для получения

25 антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изотипы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, такие как белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены

30 рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент» может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, относящегося к указанной фразе.

Термин «антигенсвязывающий домен» относится к белковой структуре антигенсвязывающего плеча, которая демонстрирует аффинность связывания для конкретного антигена. Эта белковая структура опосредована областями, определяющими комплементарность (CDR) антигенсвязывающего домена.

Термины «CDR» и множественное число для «CDR» относятся к определяющей комплементарности области (CDR), при этом три такие области определяют связывающий характер вариабельной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), и три определяют связывающий характер вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые включают скелетные или каркасные области. Точное определение границ и протяженности CDR зависит от различных систем классификации и нумерации. Поэтому CDR в настоящем документе могут упоминаться в соответствии с нумерацией по системе Kabat, Chothia, AbM, Contact или любыми другими определениями границ. Несмотря на различные границы, каждая из таких систем отличается определенной степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемую «гипервариабельную область» в пределах вариабельных последовательностей. Таким образом, определения CDR в соответствии с такими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., «Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,» *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); and MacCallum et al., «Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography,» *J. Mol. Biol.* 262:732 (1996)), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может классифицироваться как каноническая структура. Термин «каноническая структура» относится к конформации главной цепи, которую принимают антигенсвязывающие петли (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель обладают лишь ограниченным набором доступных конформаций. Каждую каноническую структуру можно охарактеризовать с помощью торсионных углов полипептидной основной цепи. Поэтому соответствующие петли между антителами могут иметь весьма сходные трехмерные структуры, несмотря на высокий уровень вариабельности аминокислотной последовательности в большинстве участков петель (Chothia et al., «Canonical Structures

For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins,» *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); Chothia et al., «Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions,» *I* 342:877 (1989); Martin and Thornton, «Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies,» *J. Mol. Biol.* 263:800 (1996)),

каждая из которых полностью включена путем ссылки. Более того, существует определенная взаимосвязь между сформированной петлевой структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация определенного канонического класса определяется длиной цепи и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в петле, а также в пределах консервативного каркаса (то есть вне петли). Поэтому отнесение к конкретному каноническому классу может производиться на основании наличия таких ключевых аминокислотных остатков.

Термин «полипептид» используется взаимозаменяемо с термином «белок» и в своем наиболее широком смысле относится к соединению с двумя или более субъединичными аминокислотами, аминокислотными аналогами или пептидомиметиками. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом варианте осуществления субъединица может быть связана другими связями, например сложноэфирными, эфирными и пр. При использовании в настоящем документе термин «аминокислота» относится к природным и/или искусственным, или синтетическим аминокислотам, включая глицин, а также D и L оптические изомеры, аналоги аминокислот и пептидомиметики. Пептид, состоящий из трех или более аминокислот, обычно называют олигопептидом, если пептидная цепочка достаточно короткая. Если пептидная цепь является длинной, то пептид обычно называют полипептидом или белком.

Используемый в настоящем документе термин «Fc» относится к кристаллизуемому домену фрагмента антитела, который содержит две константные области тяжелой цепи (CH): CH₂ и CH₃. В настоящем документе аминокислотные остатки Fc-области обычно пронумерованы в соответствии со схемой нумерации EC (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969). Эти остатки могут быть легко назначены в соответствии с альтернативными схемами нумерации, такими как нумерация по системе IMGT и Kabat (Kabat, E.A. et al., *Sequences of proteins of immunological interest*. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, pp 662,680,689 (1991)), что будет легко оценено специалистом в данной области. Например, L234 в соответствии с системой нумерации EC также может быть представлен как L247 по системе Kabat.

Термины «специфически связывается», или «связывается специфически», или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и, предпочтительно, отсутствие связывания с другими молекулами в пробе, содержащей смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее около 1×10^{-8} М, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. Такие фразы, как «[антиген]-специфическое» антитело (например, ВСМА-специфическое антитело) означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном. Если в настоящем документе используется термин «связывает», подразумевается, что он охватывает «специфически связывает», а термины могут быть взаимозаменяемыми.

В настоящем документе термин «химерный» означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного вариабельного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

«Вектор» представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космид или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомкам или к потенциальным потомкам такой клетки. Потомки такой клетки могут не быть идентичными родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например по причине мутаций или воздействия окружающей среды, которые могут проявляться в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина. Термины «экспрессия» и «продукция» используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и

дополнительно охватывают все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения.

Термин «субъект» означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, например нечеловекообразных приматов, мышей, кроликов, овец, собак, кошек, лошадей, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Во многих вариантах осуществления описанных способов субъект представляет собой человека.

Используемый в настоящем документе термин «перенаправлять» или «перенаправление» относится к способности антитела к ВСМА x GPRC5D x CD3 эффективно направлять активность Т-клеток от присущей им родственной специфичности к реактивности против клеток, экспрессирующих GPRC5D и/или ВСМА.

В контексте настоящего документа термин «проба» означает набор сходных текучих сред, клеток или тканей (например, хирургически иссеченную ткань опухоли, материал биопсии, включая материал, полученный с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), выделенных у субъекта, а также текучие среды, клетки или ткани, находящиеся внутри тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления проба представляет собой биологическую текучую среду. Биологические текучие среды, как правило, представляют собой жидкости при физиологических температурах и могут включать в себя текучие среды природного происхождения, находящиеся внутри субъекта или биологического источника, отобранные, экспрессированные или иным образом извлеченные из него. Некоторые биологические текучие среды получены из конкретных тканей, органов или локализованных областей, а некоторые другие биологические текучие среды могут иметь более глобальное или системное расположение в организме субъекта или биологического источника. Примеры биологических текучих сред включают в себя кровь, сыворотку и серозные текучие среды, плазму, лимфу, мочу, слюну, содержимое кисты, слезы, фекалии, мокроту, секрет слизистой секреторных тканей и органов, вагинальные секреты, асцитные текучие среды, например связанные с несолидными опухолями, текучие среды плевральной, перикардальной, перитонеальной, абдоминальной и других полостей тела, текучие среды, полученные смывом из бронхов, и т. п. Биологические текучие среды также могут включать в себя жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например среду для культивирования клеток или органов, в том числе среду, кондиционированную клетками или органами, промывные

текущие среды и т. п. В контексте настоящего документа термин «проба» охватывает материалы, извлеченные из организма субъекта, или материалы, находящиеся в организме субъекта. Соответствующие аспекты изобретения могут быть выполнены *in vitro* на основе выделенных образцов по мере необходимости.

5 «Известный стандарт» может представлять собой раствор, включающий в себя известное количество или концентрацию GPRC5D и/или BCMA, где раствор может представлять собой раствор природного происхождения, например пробу от пациента, имеющего, по известным данным, раннюю, среднюю или позднюю стадию рака, прогрессирующий или стабильный рак, или раствор может представлять собой
10 синтетический раствор, например водный буфер, содержащий известное количество разведенного в нем GPRC5D и/или BCMA. Известные стандарты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя GPRC5D и/или BCMA, выделенный из организма субъекта, а также рекомбинантный или очищенный белок GPRC5D и/или BCMA или значение концентрации GPRC5D и/или BCMA, связанной с состоянием
15 заболевания.

Термины «антиген созревания В-клеток» и «BCMA» в настоящем документе включают человеческий антиген созревания В-клеток, также называемый BCMA, CD269 и TNFRSF17 (UniProt Q02223), который является членом надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, предпочтительно экспрессируемых в
20 дифференцированных плазмочитах. Внеклеточный домен BCMA человека в соответствии с UniProt состоит из аминокислот 1–54 (или 5–51). В настоящем документе термин «антитело против BCMA», «антитело к BCMA» обозначает антитело, которое специфически связывается с BCMA.

Используемые в настоящем документе термины «сопряженный с G-белком
25 рецептор, семейство C, группа 5, член D» и «GPRC5D» конкретно включают в себя человеческий белок GPRC5D, например, как описывается в каталоге Genbank под учетным № BC069341, эталонная последовательность NCBI: NP_061124.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9NZD1 (см. также Brauner-Osborne, H. et al. 2001, Biochim. Biophys. Acta 1518, 237–248).

30 Термины «детерминант кластеров 3» и «CD3» включают мультисубъединичный комплекс белка CD3 человека. Состоящий из множества субъединиц белковый комплекс CD3 состоит из 6 отдельных полипептидных цепей. Сюда входят цепь CD3 γ (номер доступа в базе данных SwissProt P09693), цепь CD3 δ (SwissProt P04234), две цепи CD3 ϵ (SwissProt P07766) и один гомодимер цепи CD3 ζ (SwissProt 20963), причем

комплекс связан с цепями α и β Т-клеточного рецептора. Термин CD3 при отсутствии особых указаний включает в себя любой вариант, изоформу и видовой гомолог CD3, который в природе экспрессируется клетками (включая Т-клетки) или который может экспрессироваться на клетках, трансфицированных генами или кДНК, кодирующей эти полипептиды.

«Антитело к BCMA x GPRC5D x CD3» представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно триспецифическое антитело, которое содержит три разных антигенсвязывающих плеча, одно из которых связывается с антигеном BCMA, одно из которых связывается с антигеном GPRC5D, и одно из которых связывается с CD3. «Антитело к BCMA x CD3» представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно биспецифическое антитело, которое содержит два разных антигенсвязывающих плеча, одно из которых связывается с антигеном BCMA, а другое связывается с CD3. «Антитело к GPRC5D x CD3» представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно биспецифическое антитело, которое содержит два разных антигенсвязывающих плеча, одно из которых связывается с антигеном GPRC5D, а другое связывается с CD3. Термин «мультиспецифическое антитело» используется в настоящем документе в самом широком смысле и конкретно охватывает антитело, которое имеет полиэпитопную специфичность. Мультиспецифические антитела включают, но не ограничиваются ими, антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L), где единица $V_H V_L$ имеет полиэпитопную специфичность, антитела, имеющие два или более доменов V_L и V_H , где каждая единица $V_H V_L$ связывается с другим эпитопом, антитела, имеющие два или более одиночных переменных домена, каждый из которых связывается с отдельным эпитопом, антитела полной длины, антитела, состоящие из одного или нескольких фрагментов антител, а также антитела, состоящие из фрагментов антител, связанных ковалентно или нековалентно.

Мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое антитело, триспецифическое антитело, диатело или сходную молекулу (см., например, публикацию *PNAS USA* 90(14), 6444–8 (1993), в которой приведено описание диател). Биспецифические антитела, триспецифические антитела, диатела и т. п., предложенные в настоящем документе, помимо части BCMA или GPRC5D могут связываться с любой приемлемой мишенью. Термин «биспецифическое антитело» следует понимать как антитело, имеющее два разных антигенсвязывающих плеча, определяемых разными последовательностями антитела. Термин «триспецифическое антитело» следует

понимать как антитело, имеющее три разных антигенсвязывающих плеча, определяемых разными последовательностями антитела. Это можно понимать как связывание с разными мишенями, но также сюда входит связывание с разными эпитопами на одной мишени.

- 5 «Эталонная проба» представляет собой пробу, которую можно сравнить с другой пробой, такой как исследуемая проба, для составления характеристики сравниваемой пробы. Эталонная проба будет иметь какое-либо охарактеризованное свойство, которое служит основой для сравнения с исследуемой пробой. Например, эталонную пробу можно использовать как опорное значение концентраций GPRC5D
10 или BCMA, которые служат показателем наличия рака у субъекта. Эталонную пробу не обязательно следует анализировать параллельно с исследуемой пробой, следовательно, в некоторых случаях эталонная проба может представлять собой ранее определенное числовое значение или диапазон, характеризующий данное состояние, например уровни GPRC5D или BCMA, которые служат показателями наличия рака у субъекта.
- 15 Термин также включает в себя пробы, используемые для сравнительных целей и которые по имеющимся данным связаны с физиологическим состоянием или состоянием заболевания, например раком с экспрессией GPRC5D или BCMA, но имеющие неизвестное количество GPRC5D или BCMA.

- Термин «рецидивирующий» относится к повторному возникновению
20 заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин «рефрактерный» относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

- 25 Термин «прогрессирование» в контексте прогрессирования рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA включает в себя изменение состояния рака от менее тяжелого к более тяжелому. Прогрессирование может включать в себя увеличение количества или тяжести опухолей, степени метастазирования, скорости, с которой рак растет или распространяется, и т. п. Например, «прогрессирование рака толстой кишки» включает
30 в себя прогрессирование такого рака из менее тяжелого в более тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии I до стадии II, от стадии II до стадии III и т. п.

Термин «регресс» в контексте регресса развития рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA включает в себя изменение состояния рака от более тяжелого к менее тяжелому. Обратное развитие может включать в себя снижение количества или тяжести

опухолей, степени метастазирования, скорости, с которой рак растет или распространяется, и т. п. Например, «обратное развитие рака толстой кишки» включает в себя обратное развитие такого рака из более тяжелого в менее тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии III до стадии II, от стадии II до стадии I и т. п.

5 Термин «стабильный» в контексте стабильного рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA описывает состояние заболевания, которое существенно не изменяется или не изменилось в течение клинически значимого периода времени, чтобы его можно было считать прогрессирующим или регрессирующим.

10 Варианты осуществления, описанные в настоящем документе, не ограничиваются конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться.

Мультиспецифические антитела

15 В данном документе предложены мультиспецифические антитела, которые связываются с BCMA, GPRC5D и CD3 и их триспецифические связывающие фрагменты. Такие антитела или фрагменты антител могут обеспечивать более специфическое нацеливание на конкретные подмножества клеток по сравнению с антителами, нацеленными только на одну или две из этих мишеней.

20 Это может быть достигнуто, например, путем получения молекулы, которая содержит первое антигенсвязывающее плечо, связывающееся с CD3, второе антигенсвязывающее плечо, связывающееся с GPRC5D, и третье антигенсвязывающее плечо, связывающееся с BCMA. Антигенсвязывающие плечи способны принимать любую форму, которая обеспечивает специфическое распознавание мишени, например, плечо связывания может представлять собой или может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, Fv (комбинацию переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи), одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), Fab, домен связывания, основанный на домене фибронектина типа III (таким как домен фибронектина, или домен, основанный на консенсусной последовательности доменов фибронектина типа III, или домен теназина, или домен, основанный на консенсусной последовательности доменов теназина типа III, например молекулы центрина от

25 30 компании Janssen Biotech, Inc., см., например, WO2010/051274 и WO2010/093627). В определенных вариантах осуществления триспецифическое антитело содержит три антигенсвязывающих плеча. В некоторых вариантах осуществления триспецифическое антитело состоит из антитела (например, в формате IgG), к которому добавляют

дополнительное антигенсвязывающее плечо, например в форме одноцепочечного переменного фрагмента, например, к N или C-концу одной из тяжелой или одной из легких цепей антитела.

Соответственно, предлагаются триспецифические молекулы, содержащие три
5 разных антигенсвязывающих плеча, которые связываются с BCMA GPRC5D, и CD3 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к BCMA
х GPRC5D х CD3 содержит:

(a) первое антигенсвязывающее плечо, содержащее первый переменный домен
10 тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1);

(b) второе антигенсвязывающее плечо, содержащее второй переменный домен
тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2); и

(c) третье антигенсвязывающее плечо, содержащее третий переменный домен
тяжелой цепи (VH3) и третий переменный домен легкой цепи (VL3).

15 В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо
связывается с эпитопом на CD3, второе антигенсвязывающее плечо связывается с
эпитопом на GPRC5D, а третье антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на
BCMA.

В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо,
20 которое связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH1 SEQ ID NO: 8. В
некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо, которое
связывает CD3, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL1 SEQ ID NO: 7. В некоторых
вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3,
содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность
25 GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4), HCDR2, содержащую аминокислотную
последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и HCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность GYSSFDY (SEQ ID NO: 6). В некоторых
вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3,
содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность
30 TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), LCDR2, содержащую аминокислотную
последовательность EVSKRPS (SEQ ID NO: 2), и LCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3). В некоторых
вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3,

содержит VH1 SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит VL1 SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH2 SEQ ID NO: 16.

5 В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL2 SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), HCDR2, содержащую
10 аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), LCDR2, содержащую
15 аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит VH1 SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D,
20 содержит VL1 SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH3 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL3 SEQ ID NO: 23. В
25 некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO:
30 22); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17). В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19). В некоторых

вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит VH1 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит VL1 SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления VH1 и VL1 антигенсвязывающего плеча, которое связывается с эпитопом CD3, присутствует в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds диатело).

В некоторых вариантах осуществления VH2 и VL2 антигенсвязывающего плеча, которое связывается с эпитопом GPRC5D, присутствует в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds диатело).

В некоторых вариантах осуществления VH3 и VL3 антигенсвязывающего плеча, которое связывается с эпитопом BCMA, присутствует в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds диатело).

В некоторых вариантах осуществления первое антигенсвязывающее плечо мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит первый участок тяжелой цепи (HC1), содержащий VH1 и участок легкой цепи (LC), содержащий VL1, причем пара VH1 и VL1 образует первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген. В некоторых вариантах осуществления HC1 содержит, от N до C-конца, VH1, первый константный домен тяжелой цепи (CH1), и первый домен Fc. В некоторых вариантах осуществления VH1 и CH1 HC1 вместе с LC образуют домен антигенсвязывающего фрагмента (Fab).

В некоторых вариантах осуществления VH1 первого антигенсвязывающего плеча соединяют с VH3 третьего антигенсвязывающего плеча посредством первого Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-домен первого антигенсвязывающего плеча соединен посредством первого линкера (L1) с третьим антигенсвязывающим плечом, таким образом образуя соединение первого и третьего антигенсвязывающего плеча. Соединенное первое и третье антигенсвязывающие плечи могут содержать, от N до C-конца, VH1, домен CH1 и Fc-домен первого антигенсвязывающего плеча, первого линкера и третьего антигенсвязывающего плеча. В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), образованный из VH3 и VL3 третьего антигенсвязывающего плеча.

В некоторых вариантах осуществления второе антигенсвязывающее плечо мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит второй участок тяжелой цепи (HC2), содержащий второй переменный домен тяжелой цепи (VH2), который образует второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген. В некоторых вариантах осуществления второе связывающее плечо содержит, от N до C-конца, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), образованный из VH2 и VL2, и второй Fc-домен.

В некоторых вариантах осуществления VH2 второго антигенсвязывающего плеча соединен с VH3 третьего антигенсвязывающего плеча посредством второго Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-домен второго антигенсвязывающего плеча соединен посредством линкера с третьим антигенсвязывающим плечом, таким образом образуя соединение второго и третьего антигенсвязывающего плеча. Соединенное второе и третье антигенсвязывающие плечи могут содержать, от N до C-конца, второй антигенсвязывающий домен, второй Fc-домен, первый линкер и третье антигенсвязывающее плечо. В некоторых вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), образованный из VH3 и VL3 третьего антигенсвязывающего плеча.

В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 представляет собой триспецифическое антитело, содержащее специфичное к CD3 плечо, содержащее первый участок тяжелой цепи (HC1), содержащий VH1, и участок легкой цепи (LC), содержащий VL1. Пары доменов VH1 и VL1 образуют первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3. Второе антигенсвязывающее плечо триспецифического антитела содержит второй участок тяжелой цепи (HC2), содержащий VH2, который образует второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген. HC1 CD3-специфического связывающего плеча или HC2 второго антигенсвязывающего плеча соединяют с третьим антигенсвязывающим плечом, содержащим домен VH3, который образует третий антигенсвязывающий домен, который связывает третий антиген. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой BCMA, а третий антиген представляет собой GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой GPRC5D, а третий антиген представляет собой BCMA.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой триспецифическое антитело, содержащее специфичное к CD3 связывающее плечо, содержащее HC1 с VH1, и LC с VL1. Пары доменов VH1 и VL1 образуют первый специфичный к CD3 антигенсвязывающий домен, который связывает CD3. Второе антигенсвязывающее плечо содержит VH2 и VL2, которые образуют второй антигенсвязывающий домен, который связывает GPRC5D. Третье антигенсвязывающее плечо соединяется со вторым антигенсвязывающим плечом и содержит VH3 и VL3, которые образуют третий антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой триспецифическое антитело, содержащее специфичное к CD3 связывающее плечо, содержащее HC1 с VH1, и LC с VL1. Пары доменов VH1 и VL1 образуют первый специфичный к CD3 антигенсвязывающий домен, который связывает CD3. Второе антигенсвязывающее плечо содержит VH2 и VL2, которые образуют второй антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА. Третье антигенсвязывающее плечо соединяется со вторым антигенсвязывающим плечом и содержит VH3 и VL3, которые образуют третий антигенсвязывающий домен, который связывает GPRC5D.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой триспецифическое антитело, содержащее специфичное к CD3 связывающее плечо, содержащее HC1 с VH1, и LC с VL1. Пары доменов VH1 и VL1 образуют первый специфичный к CD3 антигенсвязывающий домен, который связывает CD3. Второе антигенсвязывающее плечо содержит VH2 и VL2, которые образуют второй антигенсвязывающий домен, который связывает GPRC5D. Третье антигенсвязывающее плечо соединяется с первым специфичным к CD3 антигенсвязывающим плечом и содержит VH3 и VL3, которые образуют третий антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой триспецифическое антитело, содержащее специфичное к CD3 связывающее плечо, содержащее HC1 с VH1, и LC с VL1. Пары доменов VH1 и VL1 образуют первый специфичный к CD3 антигенсвязывающий домен, который связывает CD3. Второе антигенсвязывающее плечо содержит VH2 и VL2, которые образуют второй антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА. Третье антигенсвязывающее плечо соединяется с первым специфичным к CD3

антигенсвязывающим плечом и содержит VH3 и VL3, которые образуют третий антигенсвязывающий домен, который связывает GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления HC1 с VH1 и LC с доменами VL1 первого антигенсвязывающего плеча образуют антигенсвязывающий фрагмент (Fab),
 5 содержащий первый антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления VH2 и VL2 второго антигенсвязывающего плеча образуют одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий второй антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления VH3 и VL3 третьего антигенсвязывающего плеча образуют одноцепочечный вариабельный
 10 фрагмент (scFv), содержащий третий антигенсвязывающий домен.

В одном варианте осуществления Cd3-связывающее плечо содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab), BCMA-связывающее плечо содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), а GPRC5D-связывающее плечо содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

15 В одном варианте осуществления CD3-связывающее плечо содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), BCMA-связывающее плечо содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab), а GPRC5D-связывающее плечо содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

В одном варианте осуществления CD3-связывающее плечо содержит
 20 одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), BCMA-связывающее плечо содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), а GPRC5D-связывающее плечо содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab).

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо триспецифического антитела содержит HC1 и LC. HC1 может содержать константные
 25 области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3) и VH1. LC может содержать VL1. VH1 и VL1 объединяются с образованием антигенсвязывающего домена CD3.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо триспецифического антитела содержит HC2. HC2 может содержать константные области тяжелой цепи (CH2 и CH3) и одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv),
 30 присоединенный на N-конце области CH2, причем scFv содержит антигенсвязывающий домен GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления триспецифическое антитело дополнительно содержит антигенсвязывающее плечо BCMA, присоединенное к С-концу области CH3 GPRC5D-связывающего плеча с образованием связывающего плеча

GPRC5D/BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее плечо BCMA содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления плечо GPRC5D/BCMA может иметь структуру: scFv, содержащий GPRC5D-связывающий домен, области CH2 и CH3, scFv, содержащий BCMA-связывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо триспецифического антитела содержит HC1 и LC. HC1 может содержать константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3) и VH1. LC может содержать VL1. VH1 и VL1 объединяются с образованием антигенсвязывающего домена CD3.

В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо триспецифического антитела содержит HC2. HC2 может содержать константные области тяжелой цепи (CH2 и CH3) и одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), присоединенный на N-конце области CH2, причем scFv содержит антигенсвязывающий домен BCMA.

В некоторых вариантах осуществления триспецифическое антитело дополнительно содержит антигенсвязывающее плечо GPRC5D, присоединенное к C-концу области CH3 CD3-связывающего плеча с образованием связывающего плеча CD3/GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее плечо BCMA содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления плечо CD3/GPRC5D может иметь структуру: Fab, содержащий CD3-связывающий домен, области CH2 и CH3, scFv, содержащий GPRC5D-связывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические антитела по изобретению включают в себя антитела, имеющие структуру полноразмерного антитела. В настоящем документе термин «полноразмерное антитело» означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Тяжелая цепь (HC) полноразмерного антитела включает в себя вариабельные и константные домены VH, CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи. Легкая цепь (LC) полноразмерного антитела включает в себя вариабельные и константные домены VL и CL легкой цепи. Полноразмерное антитело может не содержать C-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях. Термин «Fab-плечо» или «полумолекула» означает одну пару тяжелая цепь — легкая цепь, которая связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления один из антигенсвязывающих

доменов представляет собой основанный не на антителе домен связывания, например домен связывания, основанный на домене фибронектина типа 3, например центрин.

BCMA-связывающее плечо

Мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, описанное в данном документе, содержит антигенсвязывающее плечо, специфичное к BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывает BCMA человека. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывает BCMA человека и BCMA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA человека, но не связывается с BCMA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с эпитопом, включающим один или более остатков из внеклеточного домена (ECD) BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи BCMA BCMW37.

BCMA-связывающие плечи могут связываться с BCMA с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или 5×10^{-10} М или менее. В одном варианте осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA с аффинностью от около 1×10^{-10} М до 1×10^{-7} М. В одном варианте осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA с аффинностью около 1×10^{-10} М, около 2×10^{-10} М, около 3×10^{-10} М, около 4×10^{-10} М, около 5×10^{-10} М, около 6×10^{-10} М, около 7×10^{-10} М, около 8×10^{-10} М, около 9×10^{-10} М, около 1×10^{-9} М, около 2×10^{-9} М, около 3×10^{-9} М, около 4×10^{-9} М, около 5×10^{-9} М, около 6×10^{-9} М, около 7×10^{-9} М, около 8×10^{-9} М или около 9×10^{-9} М. В одном варианте осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA с аффинностью от около 1×10^{-10} до 5×10^{-10} М, от около 1×10^{-10} до 8×10^{-10} М, от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М, от около 3×10^{-10} до 10×10^{-10} М, от около 4×10^{-10} до 10×10^{-10} М или от около 5×10^{-10} до 10×10^{-10} М. В одном варианте осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA с аффинностью около $8,4 \times 10^{-10}$ М, как определено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В одном варианте осуществления BCMA-связывающее плечо связывается с BCMA с аффинностью около $2,1 \times 10^{-10}$ М, как определено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В таблице 1 представлена сводная информация о примерах некоторых BCMA-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 1. Последовательности CDR типичных mAb, выработанных к человеческому BCMA

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB519	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO 20)	AISSGGSTY (SEQ ID NO 21)	DEGYSSGHYYGM DV (SEQ ID NO 22)	RASQSISSFLT (SEQ ID NO 17)	GASSRAT (SEQ ID NO 18)	QHYGSSPMYT (SEQ ID NO 19)
BCMB69	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO 33)	HDGAVAGLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB117	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO 33)	HDGAVAGLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB123	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO 33)	HDGAVAGLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB128	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO 33)	HDGATAGLFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB129	SGSYFWG (SEQ ID NO 32)	SIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO 36)	HDGAVAGLFDY (SEQ ID NO 34)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB176	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO 33)	HDGATAGLFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)
BCMB177	SSSYFWG (SEQ ID NO 38)	SIYYSGRYYNPSLKS (SEQ ID NO 164)	HDGATAGLFDY (SEQ ID NO 37)	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO 39)	DDSDRPS (SEQ ID NO 40)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO 41)

5 Характеристики некоторых BCMA-специфических антител или
антигенсвязывающих фрагментов можно найти, например, в патенте США
№ 10,072,088, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем
ссылки.

10 В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо содержит
вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
любого из антител, описанных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления
BCMA-связывающее плечо содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую
CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 1. В
некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо содержит
15 вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
любого из антител, описанных в таблице 1, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в
таблице 1. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо
конкурирует за связывание с BCMA с антителом или антигенсвязывающим
20 фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой
цепи любого из антител, описанных в таблице 1, и легкую цепь, содержащую CDR1,
CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи клона ВСМВ519, ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона ВСМВ519, ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177. В одном варианте осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона ВСМВ519.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, полученный из клона антитела, представленного в таблице 1. В некоторых примерах вариантов осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в таблице 1. В некоторых примерах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи клона ВСМВ519, ВСМВ69, ВСМВ117, ВСМВ123, ВСМВ128, ВСМВ129, ВСМВ176 или ВСМВ177. В одном варианте осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи клона ВСМВ519.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные

последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 24, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 42, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 43, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 44, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 36, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 34, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо содержит каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 45, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 33, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID

NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 46, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 164, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 164, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 37, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 39, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 40, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 41. ВСМА-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 47, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 48.

ВСМА-связывающее плечо можно получать из любого вида посредством рекомбинантных способов. Например, антигенсвязывающее плечо ВСМА может быть получено от мышей, крыс, коз, лошадей, свиней, коров, кур, кроликов, верблюдов, ослов, людей или представлять собой их химерные варианты. В целях введения человеку антигенсвязывающие фрагменты, полученные не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит антигенсвязывающие фрагменты, которые являются химерными.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее плечо содержит гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из химерных

иммуноглобулинов, цепей иммуноглобулинов или их фрагментов (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащих минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. По большей части гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент) или антигенсвязывающие фрагменты, в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, антигенсвязывающие фрагменты гуманизированного антитела будут содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку вида, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Антигенсвязывающие фрагменты гуманизированного антитела могут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

GPRC5D-связывающее плечо

Мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, описанное в данном документе, содержит антигенсвязывающее плечо, специфичное к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо связывает GPRC5D человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо связывает GPRC5D человека и GPRC5D яванского макака, предпочтительно его внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо связывает GPRC5D человека, но не связывается с GPRC5D яванского макака. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо связывается с одним или более остатками полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116.

В таблице 2 представлена сводная информация о примерах некоторых GPRC5D-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 2. Последовательности CDR типичных mAb, выработанных к человеческому GPRC5D

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B680	GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO:12)	HIFSNDEKS (SEQ ID NO:13)	MRLPYGMDV (SEQ ID NO:14)	RSSQSLVHSDGN TYLS (SEQ ID NO:9)	KISNRFF (SEQ ID NO:10)	MQATQFPHT (SEQ ID NO:11)
GC5B81	SYAIS (SEQ ID NO 49)	GIPIFGTANYAQ KFQG (SEQ ID NO 53)	ESRWGRYKLD (SEQ ID NO 57)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 67)
GC5B465 GC5B597 GC5B598	NYWMS (SEQ ID NO 50)	GISYSGGSKYYA SSVKG (SEQ ID NO 54)	AAFDGRRRAVR LD (SEQ ID NO 58)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 67)
GC5B483 GC5B599	SYFIG (SEQ ID NO 51)	IIPGKSDTRYSP SFQG (SEQ ID NO 55)	VYSFGGRHKALF DY (SEQ ID NO 59)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B596	GYTMN (SEQ ID NO 52)	LINPYNSDTNYA QKLQG (SEQ ID NO 56)	VALRVALDY (SEQ ID NO 60)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 69)
GC5B382	DYGMH (SEQ ID NO 70)	AIKYSGGSTYYA DSVKG (SEQ ID NO 77)	RAESGPGLDY (SEQ ID NO 84)	KSSQSVLYSSNN KNYLA (SEQ ID NO 91)	WASTRES (SEQ ID NO 93)	QQYYSTPLT (SEQ ID NO 95)
GC5B379	NYWMS (SEQ ID NO 50)	GISYSGGSKYYA DSVKG (SEQ ID NO 78)	AAWDFGRRRAVR LDY (SEQ ID NO 85)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 61)	AASSLQS (SEQ ID NO 64)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 67)
GC5B373	SYWIG (SEQ ID NO 71)	IIPGDS TRYSP SFQG (SEQ ID NO 79)	IGFYGRSFRIFY (SEQ ID NO 86)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B376	SYWIG (SEQ ID NO 71)	IIPGDS TRYSP SFQG (SEQ ID NO 79)	VYSFGGRHKALF DY (SEQ ID NO 59)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B385	GYAMS (SEQ ID NO 72)	AISGSGGSTYYA DSVKG (SEQ ID NO 80)	VDRSFRSRYTL DY (SEQ ID NO 87)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 62)	DASNRAT (SEQ ID NO 65)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 68)
GC5B370	SYGIS (SEQ ID NO 73)	GIPIFGNINYAQ KFQG (SEQ ID NO 81)	VSRRFKRFAYFY DY (SEQ ID NO 88)	KSSQSVLYSSNN KNYLA (SEQ ID NO 91)	WASTRES (SEQ ID NO 93)	QQYYSTPLT (SEQ ID NO 95)
GC5B602	GYSFTGYTMN (SEQ ID NO 74)	LINPYNGDTN (SEQ ID NO 82)	VALRVALDY (SEQ ID NO 60)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 69)
GC5B603	SYAMS (SEQ ID NO 75)	AISGSGGSTYYA DSVKG (SEQ ID NO 80)	SNFLPVVFDY (SEQ ID NO 89)	RASQSVRKSLA (SEQ ID NO 92)	TASNRAT (SEQ ID NO 94)	QQYFRAPIT (SEQ ID NO 96)
GC5B601	GFSLTSYNVH (SEQ ID NO 76)	VIWAGGSTNYN SALMS (SEQ ID NO 83)	DGIRLRFAY (SEQ ID NO 90)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 63)	SASYRYS (SEQ ID NO 66)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 69)

Характеристики некоторых GPRC5D-специфических антител или

5 антигенсвязывающих фрагментов можно найти, например, в патенте США

№ 10,562,968, опубликованной в США заявке US2020/0231686, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
 5 любого из антител, описанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержат переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
 10 любого из антител, описанных в таблице 2, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо конкурирует за связывание с GPRC5D с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и A CDR3 тяжелой
 15 цепи любого из антител, описанных в таблице 2, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и A CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее
 20 плечо содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 2, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, полученные из клона антитела, представленного в
 25 таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи клона GC5B680, GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603,

GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона GC5B680, GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597. В одном варианте осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона GC5B680.

В некоторых примерах вариантов осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, полученный из клона антитела, представленного в таблице 2. В некоторых примерах вариантов осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в таблице 2. В некоторых примерах вариантов осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи клона GC5B680, GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597. В одном варианте осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи клона GC5B680. В некоторых вариантах осуществления клон GPRC5D-специфического антитела может индуцировать ADCC *in vitro* с EC₅₀, составляющей 28 нМ или меньше.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 16, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 49, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 53, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 57, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 97, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 54, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 54, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 58, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 98, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 51, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 55, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID

NO: 62, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 65, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 99, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 52, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 56, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 52, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 56, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 60, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 66, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 69. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 100, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 103.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 70, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 77, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 70, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 77, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 84, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 91, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 93, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 95. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой

же или идентичный SEQ ID NO: 104, и варибельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50, CDR2 тяжелой цепи, содержащую
 5 SEQ ID NO: 78, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 50, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 78, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 85, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 61, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64, и CDR3 легкой цепи,
 10 содержащую SEQ ID NO: 67. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит варибельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит варибельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 105, и варибельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 79, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 86. В некоторых
 20 вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 79, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 86, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 65, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит варибельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит варибельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 106, и варибельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 79, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи,

содержащую SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 79, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 59, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 65, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 107, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 72, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 80, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 72, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 80, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 87, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 62, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 65, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 108, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 73, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 81, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 73, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 81, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 88, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 91, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 93, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 95. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой

же или идентичный SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 109, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 113.

5 В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 82, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 74, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 82, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 60, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 66, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 69. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 110, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 103.

20 В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 75, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 80, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 75, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 80, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 89, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 92, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 94, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 96. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 111, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76, CDR2 тяжелой цепи, содержащую

SEQ ID NO: 83, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 76, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 83, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 90, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 66, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 69. GPRC5D-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 112, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 115.

GPRC5D-связывающее плечо можно получать из любого вида посредством рекомбинантных способов. Например, антигенсвязывающее плечо GPRC5D может быть получено от мышей, крыс, коз, лошадей, свиней, коров, кур, кроликов, верблюдов, ослов, людей или представлять собой их химерные варианты. В целях введения человеку антигенсвязывающие фрагменты, полученные не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит антигенсвязывающие фрагменты, которые являются химерными.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из химерных иммуноглобулинов, цепей иммуноглобулинов или их фрагментов (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащих минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. По большей части гуманизированные антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент) или антигенсвязывающие фрагменты, в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, антигенсвязывающие

фрагменты гуманизированного антитела будут содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку вида, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Антигенсвязывающие фрагменты гуманизированного антитела могут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

10 CD3-связывающее плечо

Мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3, описанные в данном документе, содержат антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывает CD3 человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 получено из CD3-специфического антитела, которое связывает и активирует первичные Т-клетки человека и/или первичные Т-клетки яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с эпитопом на N-конце CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161)) цепи CD3ε.

CD3-связывающее плечо может связываться с CD3 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с CD3 с аффинностью около 1×10^{-8} М, около 2×10^{-8} М, около 3×10^{-8} М, около 4×10^{-8} М, около 5×10^{-8} М, около 6×10^{-8} М, около 7×10^{-8} М, около 8×10^{-8} М, около 9×10^{-8} М или около 1×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с CD3 с аффинностью от около 1×10^{-8} М до около 3×10^{-8} М, от около 2×10^{-8} М до около 4×10^{-8} М, от около 1×10^{-8} М до около 5×10^{-8} М, от около 2×10^{-8} М до около 6×10^{-8} М или от около 3×10^{-8} М до около 8×10^{-8} М. В одном варианте осуществления CD3-связывающее плечо связывается с CD3 с аффинностью около $2,5 \times 10^{-8}$ М. В одном варианте осуществления CD3-связывающее плечо связывается с CD3 с аффинностью около $3,1 \times 10^{-8}$ М. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающую аффинность определяют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Человеческий CD3ε описан как UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Антитело к CD3ε, описанное на современном уровне техники, представляет собой SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097–1100). SP34 реагирует с CD3 человека и примата. SP34 можно приобрести в компании Pharmingen. Дополнительное антитело к CD3, описанное на современном уровне техники, представляет собой UCHT-1 (см. WO2000041474). Дополнительное антитело к CD3, описанное на современном уровне техники, представляет собой BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; использованное в исследованиях GvHD фазы I/II, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 отличается от UCHT-1 и BC-3 тем, что SP-34 распознает эпитоп, присутствующий только на ε-цепи CD3 (см. Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047), а UCHT-1 и BC-3 распознают эпитоп, состоящий из ε- и γ-цепей. Последовательность антитела, идентичная последовательности антитела SP34, описана в WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 и WO2010037838. Последовательность, на 96 % идентичная VH антитела SP34, описана в US8236308 (WO2007042261).

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо контактирует с эпитопом, включающим шесть N-концевых аминокислот CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое связывающее плечо мультиспецифического антитела получают из мышинового моноклонального антитела SP34, мышинового изотипа IgG3/лямбда. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR антитела SP34. Такие CD3-связывающие плечи могут связываться с CD3 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее. CD3-специфическое связывающее плечо может представлять собой гуманизированный вариант плеча мышинового моноклонального антитела SP34. Для гуманизации антитела к CD3, из которого получают CD3-специфическое плечо, можно использовать адаптацию для человеческого каркаса (HFA).

В таблице 3 представлена сводная информация о примерах некоторых CD3-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 3. Тяжелые цепи и легкие цепи типичных CD3-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов

	Тяжелая цепь	Легкая цепь
CD3B376	CDR 1: GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4)	CDR 1: TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1)
	CDR 2: RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5)	CDR 2: EVSKRPS (SEQ ID NO: 2)
	CDR 3: GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6)	CDR 3: VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3)
	VH: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNN NAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWLYD YAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDT ALYYCARGYSSSFYDWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 8)	VL: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGT YKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSG VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 7)
	Тяжелая цепь: QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNN NAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWLYD YAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDT ALYYCARGYSSSFYDWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNRFQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)	Легкая цепь: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGT YKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSG VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 27)
CD3B219	CDR 1: TYAMN (SEQ ID NO: 117)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 122)
	CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 118)	CDR 2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 123)
	CDR 3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 119)	CDR 3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 124)
	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS (SEQ ID NO: 120)	VL: QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAV TTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEA EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 125)
	Тяжелая цепь: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE	Легкая цепь: QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAV TTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEA

DTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGL VTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 121)	EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 126)

Характеристики некоторых CD3-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов можно найти, например, в патентах США № 10,562,968 и 10,072,088, опубликованной в США заявке US2019/0382481,

5 содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит
вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи
любого из антител, описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления
CD3-связывающее плечо содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий
10 CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 3. В
некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержат вариабельный
домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из
антител, описанных в таблице 3, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий
CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 3. В
15 некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо конкурирует за
связывание с CD3 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим
тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител,
описанных в таблице 3, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи
любого из антител, описанных в таблице 3.

20 В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит
тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител,
описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее
плечо содержит легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого
из антител, описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления CD3-
25 связывающее плечо содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3

тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 3, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи любого из антител, описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи любого из антител, описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в таблице 3, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифических антител CD3-связывающее плечо содержит пару из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из таблицы 3. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона CD3B376. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона CD3B219.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 6, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 3. CD3-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 8, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 117, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 118, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 117, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 118, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 119, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 123, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 124, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 125. CD3-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит вариабельный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 120, и вариабельный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 121, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 126.

В некоторых вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи получены из известных антител к CD3, таких как, например, муромонаб-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), визилизумаб (Nuvion), TR-66 или X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, Fl 11-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, ОКТ3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 и WT-31.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD3-связывающее плечо имеет изотип IgG4, оно содержит замену (-ы) S228P, L234A, L235A, F405L и R409K в области Fc. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных человеческих Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или

антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные человеческие Т-клетки CD3⁺. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные Т-клетки CD4⁺ яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления триспецифические антитела, описанные в данном документе, могут принимать любой формат, который был описан в данной области для триспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антитела, описанные в данном документе, конструируют на основе формата биспецифического антитела. Это может быть достигнуто путем добавления третьего антигенсвязывающего плеча к биспецифическому антителу. Были описаны разные форматы биспецифических антител, и обзор по ним недавно был представлен в публикации Chames and Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276. В некоторых вариантах осуществления триспецифическое антитело содержит биспецифическое антитело, которое представляет собой диатело, кросстело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления триспецифические антитела включают IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 для стимуляции гетеродимеризации; рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, причем каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 включают Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotechthe), «выступы-во-впадины» (Genentech), CrossMAb (Roche) и

электростатически-спариваемые (Amgen), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus), DuoBody (Genmab A/S) и другие асимметричные мутации (например, Zymeworks).

5 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания включают в себя молекулы (DT)-Ig двойного нацеливания (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech), поперечношитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-body (CovX/Pfizer).

10 В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают в себя молекулы (DVD)-Ig с двойным вариабельным доменом (DVD) (Abbott), IgG-подобную биспецифическую молекулу (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

15 В некоторых вариантах осуществления слитые Fc-молекулы включают в себя слияния ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

20 В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), «двойного действия» или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический Т-клеточный активатор (BiTE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics),
25 одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

30 Полноразмерные триспецифические антитела по настоящему изобретению можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной

экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча (или полумолекулы), каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т. е. эпитопом на ВСМА (или GPRC5D) и эпитопом на CD3. Затем в биспецифическое антитело может быть введено третье антигенсвязывающее плечо, например, к С-концу первой тяжелой цепи или второй тяжелой цепи, которое может связываться с третьим эпитопом, например GPRC5D (или ВСМА).

Термин «гомодимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем документе термин «гомодимер» обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В настоящем документе термин «гетеродимеризация» обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем документе термин «гетеродимер» обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикация № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ и тем самым способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с

«выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи / модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T,
 5 T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

В некоторых вариантах осуществления триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента, описанного в данном документе, один из Fc-доменов содержит мутации T366S, L368A и Y407V, а другой Fc-домен содержит мутацию T366W. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен первого участка тяжелой цепи (HC1) первого антигенсвязывающего плеча (например, CD3-
 10 связывающего плеча) содержит мутации T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен второго участка тяжелой цепи (HC2) второго антигенсвязывающего плеча и/или третьего антигенсвязывающего плеча (например, плеча связывания GPRC5D/BCMA или плеча связывания BCMA) содержит мутацию T366W. В некоторых вариантах осуществления
 15 Fc-домен HC2 второго антигенсвязывающего плеча и/или третьего антигенсвязывающего плеча (например, плеча связывания GPRC5D/BCMA или BCMA-связывающего плеча) содержит мутации T366S, L368A и Y407V, а Fc-домен HC1 первого антигенсвязывающего плеча (например, CD3-связывающего плеча) содержит мутацию T366W.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации
 25 США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи):
 30 L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849 (Zymeworks).

В дополнение к вышеописанным способам триспецифические антитела изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в СНЗ-областях двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя триспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № W02011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к GPRC5D) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD3) конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, способствующие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом триспецифическое антитело в результате обмена Fab-плечами. Условия инкубации можно оптимально вернуть к невозстановительным условиям. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при уровне pH 5–8, например при pH = 7,0 или при pH = 7,4.

В некоторых вариантах осуществления триспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные. Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на

клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя антитела с описанными особенностями вариабельных доменов в комбинации с любым из изоформ IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa, (c) сниженной аффинностью к FcγRI (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb, (f) сниженной аффинностью к FcγRIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изоформы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изоформ IgG1, антитело содержит замену (-ы) L234A, L235A, D265S и/или K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изоформ IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домены мультиспецифического антитела, описанного в данном документе, содержат одну или более мутаций, выбранных из L234A, L235A и D265S. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены HC1 и HC2 содержат мутации L234A, L235A и D265S.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен одного из участков тяжелой цепи мультиспецифического антитела, описанного в данном документе, дополнительно содержит одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с белком А. В некоторых вариантах осуществления Fc-домены одного из участков тяжелой цепи содержат мутации H435R и/или Y436F. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен HC2 второго антигенсвязывающего плеча и/или третьего антигенсвязывающего плеча (например, плеча связывания GPRC5D/BCMA или BCMA-связывающего плеча) содержит мутации H435R и/или Y436F.

В различных вариантах осуществления третье антигенсвязывающее плечо функционально связано с Fc-доменами первого антигенсвязывающего плеча или второго антигенсвязывающего плеча посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер и может включать любую природную аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser, Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь длину, достаточную для связывания третьего антигенсвязывающего плеча и первого антигенсвязывающего плеча или второго антигенсвязывающего плеча таким образом, чтобы они формировали правильную конформацию относительно друг друга так, чтобы сохранять желаемую активность, такую как связывание с третьим антигеном (например, BCMA или GPRC5D).

В некоторых вариантах осуществления триспецифического антитела, описанного в данном документе, HC1 содержит, от N- к C-концу, VH1 первого антигенсвязывающего плеча, домен CH1, домен Fc, линкер и третье антигенсвязывающее плечо.

В некоторых вариантах осуществления триспецифического антитела, описанного в данном документе, HC2 содержит, от N- к C-концу, второе антигенсвязывающее плечо, домен Fc, линкер и третье антигенсвязывающее плечо.

В различных вариантах осуществления scFv, используемые в мультиспецифических антителах, описанных в данном документе, содержат от N- к C-концу, VH, линкер и VL (VH-L-VL) или VL, линкер и VH (VL-L-VH). В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VL, линкер и VH (VL-линкер-VH). В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, линкер и VL (VH-линкер-VL).

Линкер может иметь длину около 5–50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–40 аминокислот. В некоторых вариантах

осуществления линкер имеет длину 35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 37 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 39 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 40 аминокислот. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, представляют собой богатые Gly линкеры, содержащие Gly и Ser, Gly и Ala линкеры, содержащие Ala и Ser линкеры и другие гибкие линкеры.

Другие последовательности линкеров могут включать участки шарнирной области иммуноглобулина CL или CH1, полученные из тяжелой или легкой цепей иммуноглобулина любого изотипа. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, приведены в **таблице 4**. Дополнительные линкеры описаны, например, в межд. публ. пат. № WO2019/060695.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 128.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 152.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 153.

5 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 154.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 155.

10 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 157.

Таблица 4. Примеры линкерных последовательностей

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	25
Линкер 2	GGGSGGGS	127
Линкер 3	GGGSGGGSGGGS	128
Линкер 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	129
Линкер 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	130
Линкер 6	GGGGSGGGGSGGGGS	131
Линкер 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	163
Линкер 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	132
Линкер 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	133
Линкер 10	IRPRAIGGSKPRVA	134
Линкер 11	GKGGSGKGGSGKGGGS	135
Линкер 12	GGKSGGKGSGGKGS	136
Линкер 13	GGGKSGGKSGGGKS	137
Линкер 14	GKGKSGKGKSGKGKS	138
Линкер 15	GGGKSGGKGSGKGGGS	139
Линкер 16	GKPGSGKPGSGKPGS	140
Линкер 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	141
Линкер 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	142
Линкер 19	STAGDTHLGGEDFD	143
Линкер 20	GEGGSGEGGSGEGGS	144
Линкер 21	GGEGSGGEGSGGEGGS	145

Линкер 22	GEGESGEGESGEGES	146
Линкер 23	GGGESGGEGSGEGGS	147
Линкер 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	148
Линкер 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	149
Линкер 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	150
Линкер 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	151
Линкер 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	152
Линкер 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	153
Линкер 30	GSGS	154
Линкер 31	APAPAPAPAP	155
Линкер 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	156
Линкер 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	157

В одном варианте осуществления HC1 триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 26.

5 В одном варианте осуществления LC триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 27.

10 В одном варианте осуществления GPRC5D/BCMA-связующее плечо триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления HC1, связанная с CD3/GPRC5D, триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 29.

15 В одном варианте осуществления LC триспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 30.

В одном варианте осуществления LC BCMA-связующее плечо содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 31.

20 В одном варианте осуществления в данном документе предложено выделенное триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащее:

а) CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь (HC1) и легкую цепь (LC); и

б) GPRC5D/BCMA-связывающее плечо,

причем HC1 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую

5 же или идентичную SEQ ID NO: 26, LC содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 27, и GPRC5D/BCMA-связывающее плечо содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 28.

10 В одном варианте осуществления в данном документе предложено выделенное триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащее:

а) CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь (HC1) и легкую цепь (LC); и

б) GPRC5D/BCMA-связывающее плечо,

15 причем HC1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и GPRC5D/BCMA-связывающее плечо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

20 В одном варианте осуществления в данном документе предложено выделенное триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащее:

а) CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь (HC1) и легкую цепь (LC), причем HC1 дополнительно содержит плечо связывания GPRC5D; и

б) BCMA-связывающее плечо,

25 причем HC1 содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 29, LC содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 30, и BCMA-связывающее плечо содержит аминокислотную последовательность, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 31.

30 В одном варианте осуществления в данном документе предложено выделенное триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащее:

а) CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь (HC1) и легкую цепь (LC), причем HC1 дополнительно содержит плечо связывания GPRC5D; и

б) ВСМА-связывающееся плечо,

причем HC1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и ВСМА-связывающееся плечо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

5 В одном варианте осуществления триспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой BGCB463.

В одном варианте осуществления триспецифическое антитело к ВСМА х GPRC5D х CD3 представляет собой BGCB491.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к ВСМА х GPRC5D х
10 CD3 или антигенсвязывающими фрагментами также предложены полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к ВСМА х GPRC5D х CD3 или антигенсвязывающие фрагменты. В настоящем документе также предложены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к ВСМА х GPRC5D х
15 CD3 или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, *E. coli*). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридными клетками.
20 Описанные антитела также могут быть получены рекомбинантным способом.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность,
25 известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

Мультиспецифические антитела к ВСМА х GPRC5D х CD3 или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции
30 или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных мультиспецифических антител к ВСМА х GPRC5D х CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты

в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в

5 положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более

10 аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливают с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер

15 слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т. п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены

20 соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т. п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной

25 области.

Мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3

30 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1 или IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие

переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или

5 антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, по отношению к связыванию с APRIL могут иметь значения IC_{50} по меньшей мере 5,9 нМ. IC_{50} описанных мультиспецифических антител к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающих фрагментов могут быть определены множеством способов, известных в данной области, таких как способы, основанные на твердофазном ИФА, 10 или проточная цитометрия (FACS). В анализах, в которых IC_{50} измеряется посредством твердофазного ИФА, используются связанный с планшетом BCMA в присутствии или при отсутствии мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающего фрагмента и различные концентрации APRIL.

Мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающий 15 фрагмент, которые блокируют связывание APRIL с BCMA, называют «блокирующими APRIL при измерении посредством твердофазного ИФА».

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие 20 последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев 25 широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, 30 относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания

мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна — Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующая последовательность мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента находится под контролем индуцибельного промотора, например промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более интерферон-стимулируемых реагирующих

элементов (ISRE), промоторов протеинкиназы R 2',5'-олигоаденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т. п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя, например, маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину, ген резистентности к пурамицину, ген резистентности к бластицидину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, другой аспект изобретения описывает клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий BCMA, GPRC5D или CD3, например

антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примерами в настоящем документе.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т. п. (описано в публикации Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, подходящим для применения в экспрессии мультиспецифических антител к ВСМА x GPRC5D x CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки НЕК293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и т. п. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий

уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Терапевтическая композиция и способы лечения с применением

мультиспецифических антител и их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов

Мультиспецифические антитела, описанные выше, например триспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3, находят применение в терапии. В частности, мультиспецифические антитела находят применение при лечении рака. В настоящем документе также предлагаются терапевтические композиции для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих, содержащие терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или мультиспецифического антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA, включая (без ограничений) следующее: В-клеточные виды рака, экспрессирующие GPRC5D и/или BCMA, такие как множественная миелома (MM), включая тлеющую множественную миелому (SMM); и другие виды рака, которые пока не определены как экспрессирующие GPRC5D и/или BCMA. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. Конкретные триспецифические антитела, которые возможно применять для лечения рака, например гемобластоза,

включая описанные выше конкретные виды рака, включают в себя антитела BGCB463 и BGCB491.

В некоторых вариантах осуществления триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 или его связывающий фрагмент используют для лечения

5 рефрактерной/рецидивирующей множественной миеломы.

В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 или его связывающий фрагмент, получал предшествующее лечение. Например, субъект мог получать одно или более терапевтических средств, таких как ингибиторы протеасом (PI) (например, маризомиб (салиноспирамид A), карфилзомиб, иксазомиб), иммуномодулирующие лекарственные средства (IMiD), биспецифические агенты, терапия CAR-T и/или антитела к CD38, для

10 лечения множественной миеломы.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, содержат: а) эффективное количество мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения и b) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более

15 предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемые носители» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты и т. п., которые

20 являются физиологически совместимыми. Примеры приемлемых носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают в себя одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), декстрозы, глицерина, этанола и т. п., а также любую их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные

25 спирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры приемлемого носителя включают в себя: (1) фосфатно-солевой буферный раствор по Дульбекко, pH около 7,4, содержащий или не содержащий от около 1 мг/мл до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия

30

(NaCl)) и (3) 5% (мас./об.) декстрозу; и он также может содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Твин 20[®].

Композиции, описанные в настоящем документе, также могут содержать дополнительный терапевтический агент, являющийся необходимым для конкретного подлежащего лечению расстройства. Предпочтительно, чтобы мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела и дополнительное активное соединение имели комплементарные виды активности, которые не влияют друг на друга отрицательным образом. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, такой как антитело к CD38 (например, даратумумаб). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), такое как леналидомид и помалидомид. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, такой как анти-PD-1 и анти-Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунный костимулирующий агент, такой как агенты, нацеленные на CD137 (например, костимулирующее биспецифическое антитело к CD137). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой Т-клеточный энхансер, например добавление IL-2.

Композиции изобретения могут быть представлены в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, но предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и от терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов, пригодных для инъекции или инфузии. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления

выполняют внутривенное болюсное введение композиций изобретения, либо их вводят в виде непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их вводят внутримышечно, подкожно, внутрисуставно, внутрь опухоли, около опухоли, в пораженную ткань или около пораженной ткани, чтобы они оказывали локальный и системный терапевтические эффекты.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать путем введения антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела настоящего изобретения в нужном количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. В качестве растворителя или носителя можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т. п., а также их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, в частности, смачивающие, изотонизирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерильные композиции для парентерального введения также можно получать в виде стерильных твердых композиций, растворяемых во время применения в стерильной воде или любой другой пригодной для инъекций стерильной среде.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела также можно вводить перорально. В качестве твердых композиций для перорального применения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, пакеты-саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент в соответствии с изобретением в потоке аргона смешивают с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или диоксид кремния. Эти композиции также могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, краситель, покрытие (таблетка с сахарным покрытием) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, смачивающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и применяемого способа введения; они по существу составляют от 5 мг до 1000 мг в сутки перорально для взрослых, при разовых дозах в диапазоне от 1 мг до 250 мг активного вещества. В целом соответствующую дозировку определяет врач в зависимости от возраста, массы тела и других факторов, специфичных для подлежащего лечению субъекта.

Также в настоящем документе предложены способы уничтожения клеток GPRC5D и/или BCMA+ путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, мультиспецифического антитела, которое связывает указанный GPRC5D и/или BCMA и способно рекрутировать Т-клетки для уничтожения указанных GPRC5D и/или BCMA+ клеток (т. е. перенаправление Т-клеток). В терапевтических целях можно использовать любые из мультиспецифических антител или фрагментов антител изобретения. Например, в одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 можно использовать с терапевтической целью для лечения рака у субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифические антитела или фрагменты антител изобретения применяют для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих. В более предпочтительном варианте осуществления для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих применяют одну из вышеописанных фармацевтических композиций, содержащих мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела изобретения. В одном варианте осуществления расстройство представляет собой рак. В частности, рак представляет собой рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака, экспрессирующие GPRC5D и/или BCMA, такие как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM); и другие виды рака, которые пока не определены как экспрессирующие GPRC5D и/или BCMA. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x

CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно, фармацевтические композиции по изобретению могут применяться для лечения или предотвращения различных видов рака или расстройств, включая (без ограничений) следующие: рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные/плазмноклеточные виды рака с экспрессией GPRC5D и/или BCMA, такие как острая множественная миелома (MM) или предраковые миеломы, такие как MGUS (моноклональная гаммапатия неясного генеза) и SMM (тлеющая множественная миелома) и плазмцитомы; и другие виды рака, которые пока не определены, при которых экспрессируется GPRC5D и/или BCMA, или другие плазматические расстройства, такие как амилоидоз и волчанка. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы.

Аналогично в настоящем документе дополнительно предложен способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий приведение экспрессирующих GPRC5D и/или BCMA клеток-мишеней или ткани, содержащей такие клетки-мишени, в контакт с эффективным количеством мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими цитотоксическими или терапевтическими агентами, в присутствии моноклеарных клеток периферической крови (PBMC). Антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, которое блокирует связывание лигандов (APIL, BAFF и другие) с BCMA и GPRC5D, может блокировать опосредованную BCMA и GPRC5D сигнализацию и приводить к ингибированию или гибели клеток-мишеней. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включающие введение мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции, содержащей его, дополнительно включают введение другого терапевтического агента. Подходящие другие терапевтические агенты

включают, без ограничений, агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер (например, добавление IL-2), тоцилизумаб или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, такой как антитело к CD38 (например, даратумумаб). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), такое как леналидомид и помалидомид. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, такой как анти-PD-1 и анти-Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунный костимулирующий агент, такой как агенты, нацеленные на CD137 (например, костимулирующее биспецифическое антитело к CD137). Применение низкоаффинного связывающего CD137 с условным агонизмом в присутствии антитела, перенаправляющего Т-клетки, такого как триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, описанное в данном документе, может усиливать противоопухолевую активность и потенциально улучшать устойчивость Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Способ ингибирования роста выбранных популяций клеток можно использовать на практике *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Примеры применения *in vitro* включают обработку аутогенного костного мозга перед его трансплантацией тому же пациенту с целью уничтожения пораженных или злокачественных клеток; и профилактики болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD); обработку клеточных культур с целью уничтожения всех клеток, за исключением нужных вариантов, которые не экспрессируют антиген-мишень; или с целью уничтожения вариантов, экспрессирующих нежелательный антиген. Условия неклинического применения *in vitro* может легко определить специалист в данной области.

Примером клинического применения *ex vivo* является удаление опухолевых клеток из костного мозга перед аутотрансплантацией при лечении рака. Лечение можно

проводить описанным ниже образом. Костный мозг берут у пациента или другого субъекта, а впоследствии инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавлен цитотоксический агент изобретения. Концентрации варьируются от около 10 мкМ до 1 мкМ в течение от около 30 мин до около 48 ч при температуре около 37 °С. Точные значения концентрации и времени инкубации, т. е. дозы, могут быть легко определены специалистом в данной области. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту путем в/в инфузии в соответствии с известными способами. В тех случаях, в которых между моментом отбора костного мозга и обратного введения обработанных клеток пациент получает другие виды лечения, например курс абляционной химиотерапии или облучения всего тела, обработанные клетки костного мозга хранят замороженными в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

При клиническом применении *in vivo* терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента вводят нуждающемуся в таком лечении субъекту. Например, мультиспецифические антитела к BCMA x GPRC5D x CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией BCMA и/или GPRC5D у нуждающегося в таком лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой В-клеточный рак, например множественную миелому (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM). В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D и/или BCMA представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде раствора, протестированного на стерильность.

Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить по показаниям терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут готовить в виде стандартных единиц дозирования для упрощения введения и унификации дозирования.

Эффективные дозировки и схемы дозирования мультиспецифических антител и фрагментов зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и могут быть определены специалистом в данной области. Не имеющим ограничительного характера примером диапазона терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения является диапазон около 0,001–10 мг/кг, например около 0,001–5 мг/кг, например около 0,001–2 мг/кг, например около 0,001–1 мг/кг, например около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг.

Врач, фармацевт или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с более низких доз мультиспецифического антитела или фрагмента, входящих в фармацевтическую композицию, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. В целом приемлемой суточной дозой мультиспецифического антитела по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное, внутриопухолевое (например, в костный мозг) или подкожное. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозы, например, можно рассчитать на основании доз в мг/кг, описанных выше, согласно следующей формуле: доза (мг/кг) × масса тела (например, 50–100 кг). Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например от 3 до 5 раз. Введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного времени, например более 24 часов, чтобы уменьшить побочные токсические эффекты.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в еженедельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, вводимая до восьми раз, например от четырех до шести раз, один раз в неделю. Такую схему можно повторять один или более раз по мере необходимости, например, через шесть месяцев или двенадцать месяцев. Такие фиксированные дозы, например, могут быть основаны на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 50–100 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество мультиспецифического антитела настоящего изобретения в крови после введения, например, путем получения биологической пробы и использования антиидиотипических антител, нацеленных на плечи связывания GPRC5D и/или BCMA мультиспецифических антител по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода в шесть или более месяцев.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака.

Мультиспецифические антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т. е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно, в одном варианте осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент, агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер (например, добавление IL-2) или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, такой как антитело к CD38 (например, даратумумаб). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), такое как леналидомид и помалидомид. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек,

такой как анти-PD-1 и анти-T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунный костимулирующий агент, такой как агенты, нацеленные на CD137 (например, костимулирующее биспецифическое антитело к CD137). В некоторых вариантах осуществления другой терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным, в любом порядке. При одновременном введении агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, в зависимости от ситуации.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения расстройства у субъекта с вовлечением клеток, экспрессирующих GPRC5D и/или BCMA, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например мультиспецифического антитела к BCMA x GPRC5D x CD3, описанного в настоящем документе, и проведение лучевой терапии. В одном варианте осуществления предложен способ лечения или предотвращения рака, причем способ включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например антитела к BCMA x GPRC5D x CD3, описанного в настоящем документе, и проведение лучевой терапии. Предлагается лучевая терапия, которая может включать облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечение пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иод-123, иод-131, актиний-225 и индий-111.

Наборы

В настоящем документе также предлагаются наборы, например, содержащие описанное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и инструкции по применению антитела или фрагментов для уничтожения определенных типов клеток. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое

антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его

5 триспецифический к BCMA x GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

Инструкции могут включать в себя указания по применению мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Как правило, набор имеет отделение, содержащее мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Мультиспецифическое антитело или
10 его антигенсвязывающий фрагмент могут быть представлены в лиофилизированном виде, жидком виде или другом виде, пригодном для включения в набор. Набор также может содержать дополнительные элементы, необходимые для практического применения описанного способа согласно инструкциям к набору, например, стерилизованный раствор для разведения лиофилизированного порошка,
15 дополнительные агенты для комбинирования с мультиспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом перед введением пациенту, и инструменты, способствующие введению мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту.

20 **Диагностические виды применения**

Мультиспецифические антитела и фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно применять для диагностических целей. Следовательно, также предлагаются диагностические композиции, содержащие мультиспецифическое антитело или фрагменты, описанные в настоящем документе, и их применение. В
25 предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3, как описано в настоящем документе, или его триспецифический к BCMA x
30 GPRC5D x CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен набор для диагностики рака, содержащий контейнер, который содержит триспецифическое антитело к BCMA x GPRC5D x CD3 и один или более реагентов для обнаружения связывания антитела с GPRC5D и/или BCMA. Реагенты могут включать в себя, например, флуоресцентные метки,

ферментативные метки или другие обнаруживаемые метки. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем в результате ферментативных реакций образуется продукт, который можно визуализировать. Например, мультиспецифические антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпитопной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТРА), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и бета-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными в данной области.

BCMA-специфические антитела

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с BCMA человека. Общая структура молекулы BCMA-специфического антитела может содержать антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

В некоторых вариантах осуществления предлагается BCMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в таблице 1 (например, BCMB519). В некоторых вариантах осуществления предложено BCMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в таблице 1 (например, BCMB519), и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в таблице 1 (например, BCMB519).

В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, CDR2 легкой цепи,

содержащую SEQ ID NO: 18, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19.

BCMA-связывающее плечо может содержать каркасные последовательности человека.

В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO:

5 24. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающее плечо содержит переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 24, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 23. Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антител, описанных в настоящем пункте, являются приемлемыми для введения в
10 мультиспецифические (например, биспецифические или триспецифические) конструкции, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к BCMA. Примеры триспецифических конструкций, содержащих BCMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном пункте, представлены в данном документе.

15 В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с BCMA человека и BCMA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с BCMA человека, но не с BCMA яванского макака. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфические
20 антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из внеклеточного домена (ECD) BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфическое антитело и антигенсвязывающий фрагмент связываются с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи BCMA BCMW37. Такое BCMA-специфическое антитело или антигенсвязывающий
25 фрагмент может связываться с BCMA с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 5×10^{-10} М или менее. В одном варианте осуществления BCMA-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с BCMA с аффинностью от около 1×10^{-10} М до 1×10^{-9} М. В одном варианте осуществления BCMA-связывающее
30 плечо связывается с BCMA с аффинностью около 1×10^{-10} М, около 2×10^{-10} М, около 3×10^{-10} М, около 4×10^{-10} М, около 5×10^{-10} М, около 6×10^{-10} М, около 7×10^{-10} М, около 8×10^{-10} М, около 9×10^{-10} М или около 1×10^{-9} М. В одном варианте осуществления BCMA-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с BCMA с аффинностью около $8,4 \times 10^{-10}$ М, как определено с помощью

анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В одном варианте осуществления ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с ВСМА с аффинностью около $2,1 \times 10^{-10}$ М, как определено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

5 Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и
10 комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем
15 документе, включают в себя антитела с описанными особенностями переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

 При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc
20 эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с
25 активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

30 В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa, (c) сниженной аффинностью к FcγRI (d) сниженной

аффинностью к FcγRIIa (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb, (f) сниженной аффинностью к FcγRIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замены L234A, L235A, D265S и/или K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены K409R, S228P, L234A и L235A в области Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления описанные антитела могут быть способны ингибировать связывание с APRIL с IC₅₀ низкой наномолярности при измерении посредством твердофазного ИФА. В некоторых вариантах осуществления описанные антитела могут быть способны ингибировать связывание с BAFF с IC₅₀ низкой наномолярности при измерении посредством твердофазного ИФА.

В некоторых вариантах осуществления описанные антитела связываются с ВСМА-положительными клеточными линиями множественной миеломы.

Наряду с описанными ВСМА-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293, 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, *E. coli*). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками.

К описанным ВСМА-специфическим антителам или антигенсвязывающим фрагментам относятся все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулинов. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, по существу обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида посредством рекомбинантных способов. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козьи, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, ламовые, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученных не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. В настоящем документе термин «химерный» означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного варибельного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в таблице 1 (например, BCMB519).

В настоящем документе описаны рекомбинантные антитела и
 5 антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в настоящем документе в качестве примера, являются человеческими, антитела или
 10 антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет
 15 изотип IgG1, антитело содержит область Fc IgG1 (SEQ ID NO: 158).

SEQ ID NO: 158

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 20 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1,
 25 антитело содержит замены L234A, L235A и D265S (подчеркнуто) в области Fc (SEQ ID NO: 159).

SEQ ID NO: 159

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 30 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4,
 антитело содержит замены S228P, L234A и L235A (подчеркнуто) в области Fc (SEQ ID
 NO: 160).

SEQ ID NO: 160

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNV⁵DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

10 BCMA-специфические антитела, определяющиеся последовательностями CDR и/или
вариабельных доменов, как описано в пунктах выше, могут включать в себя эти
области Fc IgG.

Кроме того, описаны выделенные синтетические полинуклеотиды, кодирующие
антитела или антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с BCMA. Выделенные
полинуклеотиды, способные кодировать сегменты вариабельных доменов,
15 предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные
векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки,
также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные
полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную
20 последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность,
известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без
ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

BCMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты,
описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные
25 или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения,
сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или
иммунную эффекторную активность) описанных BCMA-специфических антител или
антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при
отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие
30 обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например,
как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и ii) для
конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные
коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким
образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена
35 лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X.
Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Специалист может получать

варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя: (а) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (с) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливают с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т. п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т. п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

BCMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1 или IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

BCMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, по отношению к связыванию с APRIL имеют значения IC_{50} низкой наномолярности. IC_{50} описанных BCMA-специфических антител

или антигенсвязывающих фрагментов могут быть определены множеством способов, известных в данной области, таких как способы, основанные на твердофазном ИФА, или проточная цитометрия (FACS). В анализах, в которых IC_{50} измеряется посредством твердофазного ИФА, используются связанный с планшетом ВСМА в присутствии или при отсутствии ВСМА-специфического антитела и различные концентрации APRIL. Антитело к ВСМА, которое блокирует связывание APRIL с ВСМА, называется «блокирующим APRIL при измерении посредством твердофазного ИФА».

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы.

Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть построена

точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть
 5 получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов:
 10 гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам
 15 относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна — Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого
 20 герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность ВСМА-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента находится под контролем индуцибельного промотора, например, промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более интерферон-стимулируемых
 25 реагирующих элементов (ISRE), промоторов протеинкиназы R 2',5'-олигоаденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т. п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в
 30 слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов

(т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

5 Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя, например, маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину, 10 ген резистентности к пурамицину, ген резистентности к бластицидину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже 15 нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для 20 получения клеток, продуцирующих ВСМА-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, в другом аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с ВСМА, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, 25 описанные и подтвержденные примерами в настоящем документе.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем 30 документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно

использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т. п. (описано в публикации Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, приемлемым для применения в экспрессии ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и т. п. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Способы применения ВСМА-специфических антител для лечения

В настоящем документе предлагаются ВСМА-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для применения в терапии. В частности, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно применять при лечении рака, например

рака с экспрессией ВСМА, или других расстройств с экспрессией ВСМА.

Соответственно, в изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение антитела, описанного в настоящем документе, например, ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Например, применение
5 может осуществляться путем блокировки взаимодействий рецептора ВСМА или там, где антитело конъюгируют с токсином, таким образом, направляя токсин к раку, экспрессирующему ВСМА. В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией ВСМА включают лимфому, такую как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM), или амилоидоз,
10 плазмоклеточный лейкоз и волчанку. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. Антитела для применения в этих способах включают антитела, описанные выше в настоящем документе, такие как ВСМА-специфическое антитело или
15 антигенсвязывающий фрагмент со свойствами, описанными в таблице 1 (например, ВСМВ519), например с последовательностями CDR или переменных доменов, которые также представлены в дальнейшем описании этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффекторные свойства ВСМА-специфических антител могут быть усилены или
20 ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области и описанных в данном документе. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая
25 регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т. п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность», или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические
30 цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные (ЕК) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека

претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или активности CDC. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249–65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733–26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение крысиной гибридной клеточной линии YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466–3473, 2003), введение малых интерферирующих РНК, особенно к гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901–908, 2004), или коэкспрессия бета-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и альфа-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032–5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851–861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652–65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную антителами к ВСМА, также можно усилить путем введения некоторых замен в область Fc антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом EU), как описано в патенте США № 6737056.

30 Способы обнаружения ВСМА

В настоящем документе предлагаются способы обнаружения ВСМА в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы,

слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигльной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

5 В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают обнаружение ВСМА в биологической пробе путем приведения пробы в контакт с любым из ВСМА-специфических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

10 В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с более чем одним из ВСМА-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, пробу можно приводить в контакт с первым ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем приводить в контакт со вторым ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или
15 антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например поверхности многолуночного планшета, чипа, либо к сходному
20 субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ни к чему не прикреплены или не зафиксированы.

Описанные ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах
25 осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение ВСМА посредством способов, описанных в настоящем документе. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или
30 ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In - диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т. п.

Описанные ВСМА-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения ВСМА в биологической пробе. Некоторые приемлемые анализы включают без ограничений вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, обнаружение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА, у субъекта можно использовать для определения того, можно ли лечить субъекта терапевтическим агентом, направленным против ВСМА.

ВСМА присутствует в определенных концентрациях в пробах крови и сыворотки. Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы обнаружения ВСМА в пробе, полученной из крови, например, пробе сыворотки, путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с ВСМА. Пробу крови или ее производное можно разводить, фракционировать или иным способом обрабатывать для получения пробы, на которой можно осуществить описанный способ. В некоторых вариантах осуществления ВСМА можно обнаруживать в пробе крови или в ее производном при помощи любого количества анализов, известных специалистам в данной области, например, без ограничений, таких как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА. В некоторых вариантах осуществления способы являются способами *in vitro*.

Способы диагностики рака или расстройства

В настоящем документе предложены способы диагностики у субъекта рака или расстройства с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией ВСМА включают лимфому, такую как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM), или амилоидоз, плазмочелочный лейкоз и волчанку. В некоторых вариантах осуществления, как

описано выше, обнаружение ВСМА в биологической пробе, например, в пробе крови или сыворотки, обеспечивает возможность диагностики рака у субъекта, от которого была получена проба. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления для оценки того, имеется ли рак у субъекта, от которого была получена проба, можно использовать другие пробы, например гистологическую пробу, пробу, полученную с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии, хирургически иссеченную ткань опухоли, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки и т. п. В некоторых вариантах осуществления уже может быть известно, что субъект, от которого получена проба, имеет рак, но тип рака у субъекта может быть еще не диагностированным, или предварительный диагноз может быть неточным, и, следовательно, обнаружение ВСМА в биологической пробе, полученной от субъекта, может позволить поставить или уточнить диагноз рака. Например, может быть известно, что у субъекта имеется рак, но может быть неизвестно или неочевидно, является ли он раком, экспрессирующим ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, поражен ли субъект раком или расстройством с экспрессией ВСМА, путем определения количества ВСМА, присутствующего в биологической пробе, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе, причем разница между количеством ВСМА в пробе, полученной от субъекта, и количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе служит указанием на то, что субъект поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА. В другом варианте осуществления количество ВСМА, наблюдаемое в биологической пробе, полученной от субъекта, можно сравнить с уровнями ВСМА, которые, по имеющимся данным, ассоциированы с определенными формами или стадиями рака, с целью определения формы или стадии рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в пробе, полученной от субъекта, оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с ВСМА, например, с ВСМА-специфическими антителами, описанными в настоящем документе. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией ВСМА включают гемобластоз, например множественную миелому (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM), или амилоидоз, плазмоклеточный лейкоз и волчанку.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способ диагностики рака или расстройства с экспрессией ВСМА будет включать приведение биологической пробы субъекта в контакт с ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в таблице 1 (например, ВСМВ519)), определение количества ВСМА, присутствующего в пробе, при связывании с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с известной стандартной или эталонной пробой и определение того, попадают ли уровни ВСМА субъекта в пределы уровней ВСМА, связанных с раком или расстройством. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия введения или назначения ВСМА-специфического лечения. В другом варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия передачи результатов определения для облегчения лечения рака или расстройства. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфическое лечение может быть направлено против типов рака или расстройств с экспрессией ВСМА, например мультиспецифические антитела к ВСМА x CD3, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, поражен ли субъект раком или расстройством с экспрессией ВСМА, путем определения количества ВСМА, присутствующего в пробе крови или сыворотки, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе, причем разница между количеством ВСМА в пробе, полученной от субъекта, и количеством ВСМА в контрольной или эталонной пробе служит указанием на то, что субъект поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления контрольную или эталонную пробу можно получить от субъекта, не пораженного раком или расстройством с экспрессией

ВСМА. В некоторых вариантах осуществления контрольную или эталонную пробу можно получить от субъекта, пораженного раком или расстройством с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, не пораженного раком или расстройством с экспрессией

 5 ВСМА, наблюдаемое увеличение количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная проба получена от субъекта, не пораженного раком или расстройством с экспрессией ВСМА,

 10 наблюдаемое уменьшение или сходство количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект не поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, пораженного раком или расстройством с экспрессией

 15 ВСМА, наблюдаемое сходство количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольная или эталонная проба получена от субъекта, пораженного раком или расстройством с экспрессией ВСМА, наблюдаемое

 20 уменьшение количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольной или эталонной пробе является указанием на то, что субъект не поражен раком или расстройством с экспрессией ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в пробе, полученной от субъекта, оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или его

 25 антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с ВСМА, например с антителами, описанными в настоящем документе. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из пробы крови, пробы сыворотки, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов

 30 биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

В различных аспектах количество ВСМА определяют путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт

более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с ВСМА, а затем приводить в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с ВСМА. В этом качестве можно использовать ВСМА-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, такие как описанные в настоящем документе.

Для осуществления описанных способов диагностики в качестве «первого» и «второго» антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации ВСМА-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией ВСМА включает лимфому, такую как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM). В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы.

В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА определяют таким методом, как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

В различных вариантах осуществления описанных способов диагностики используют контрольную или эталонную пробу. Эта проба может представлять собой положительный или отрицательный аналитический контроль, гарантирующий, что анализ работает должным образом; например, аналитический контроль такого рода можно обычно использовать для иммуногистохимических анализов. Альтернативно проба может представлять собой стандартизованный эталон количества ВСМА в биологической пробе от здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровни ВСМА, наблюдаемые у исследуемого субъекта, можно сравнивать с уровнями ВСМА, наблюдаемыми в пробах от субъектов с известным диагнозом рака или расстройства с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления контрольный субъект может быть поражен конкретным представляющим интерес видом рака или расстройства. В некоторых вариантах осуществления известно, что

контрольный субъект имеет раннюю стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет промежуточную стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет позднюю стадию рака, который может быть или может не быть раком, экспрессирующим ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления способы диагностики рака или расстройства представляют собой способы *in vitro*.

10 Способы контроля рака или расстройства

В настоящем документе предложены способы контроля рака или расстройств с экспрессией ВСМА у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией ВСМА включают лимфому, такую как множественная миелома (ММ), включая тлеющую множественную миелому (SMM), или амилоидоз, плазмоклеточный лейкоз и волчанку. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией ВСМА представляет собой рецидивирующую или рефрактерную форму лимфомы, такую как рецидивирующая или рефрактерная форма множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают оценку того, прогрессирует, регрессирует или остается стабильным рак или расстройство с экспрессией ВСМА, путем определения количества ВСМА, присутствующего в исследуемой пробе, полученной от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества ВСМА с количеством ВСМА в биологической пробе, полученной сходным образом у субъекта в более ранний момент времени, причем различие между количеством ВСМА в исследуемой пробе и ранее полученной пробе служит показателем того, является ли рак прогрессирующим, показывающим обратное развитие или стабильным. В этом отношении увеличенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на прогрессирование рака или расстройства с экспрессией ВСМА. Напротив, уменьшенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на регресс рака или расстройства с экспрессией ВСМА.

Соответственно, незначительное различие количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на стабильное течение рака или расстройства с экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления количество ВСМА в биологической пробе, полученной от субъекта,

оценивают путем приведения пробы в контакт с антителом или фрагментом антитела, связывающимся с ВСМА, например с антителами, описанными в настоящем документе. Пробу, оцениваемую на наличие ВСМА, можно получить из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток,

5 циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

10 В некоторых вариантах осуществления способы контроля рака или расстройства с экспрессией ВСМА будут включать приведение биологической пробы от субъекта в контакт с ВСМА-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в таблице 1 (например, ВСМВ519)), количественную оценку ВСМА, присутствующего в пробе, 15 сравнение количества ВСМА, присутствующего в пробе, с количеством ВСМА, определенном в биологической пробе, полученной сходным образом от того же субъекта в более ранний момент времени; и определение того, изменился ли уровень ВСМА у субъекта со временем. Увеличенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с количеством в ранее полученной пробе может указывать на 20 прогрессирование рака. Напротив, уменьшенное количество ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на регресс рака или расстройства с экспрессией ВСМА. Соответственно, незначительное различие количества ВСМА в исследуемой пробе по сравнению с ранее полученной пробой может указывать на стабильное течение рака или расстройства с экспрессией ВСМА. В 25 некоторых вариантах осуществления уровни ВСМА в пробе можно сравнивать с известным стандартом или эталонной пробой отдельно или в качестве дополнения к сравнению с уровнями ВСМА, которые наблюдали в пробе в более ранний момент времени. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия введения ВСМА-специфического 30 лечения. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-специфическое лечение может быть направлено против типов рака или расстройств с экспрессией ВСМА, например мультиспецифические антитела к ВСМА x CD3, описанные в настоящем документе.

В различных аспектах количество ВСМА определяют путем приведения пробы в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с

BCMA. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с BCMA. В некоторых вариантах осуществления пробу можно приводить в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с BCMA, а затем приводить в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с BCMA. В этом качестве можно использовать антитела, такие как описанные в настоящем документе.

Для осуществления описанных способов контроля в качестве «первого» и «второго» антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации антител и антигенсвязывающих фрагментов, как описано в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления рак или расстройство с экспрессией BCMA включают гемобластоз, например острый миелоидный лейкоз (AML) или лимфому (например, множественную миелому (MM), тлеющую множественную миелому (SMM)), или амилоидоз, плазмоклеточный лейкоз и волчанку.

В некоторых вариантах осуществления количество BCMA определяют таким методом, как вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА. В некоторых вариантах осуществления способы являются способами *in vitro*.

Наборы для обнаружения BCMA

В настоящем документе предлагаются наборы для обнаружения BCMA в биологической пробе. Эти наборы включают в себя одно или более BCMA-специфических антител, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающий фрагмент и инструкции по применению набора.

Предлагаемое BCMA-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут находиться в растворе; быть лиофилизированными; прикрепленными к субстрату, носителю или планшету; или могут быть мечеными с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения пробы от субъекта,

контрольной или эталонной пробы, например пробы от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта без рака, одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

5 Средства для определения уровня ВСМА могут, например, дополнительно включать в себя буферные растворы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня ВСМА. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии ВСМА.

10 Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения пробы от субъекта. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от субъекта. Средства для получения пробы от субъекта также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из пробы крови.

15 Предпочтительно набор предназначен для применения у человеческого индивида.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В настоящем документе также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

20 Вариант осуществления 1. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(а) первое антигенсвязывающее плечо, содержащее первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1);

25 (а) второе антигенсвязывающее плечо, содержащее второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2);

(с) третье антигенсвязывающее плечо, содержащее третий переменный домен тяжелой цепи (VH3) и третий переменный домен легкой цепи (VL3),

причем первое антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), а
30 третье антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на антигене созревания В-клеток (BCMA).

Вариант осуществления 2. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 1, в котором VH1 и VL1 первого

антигенсвязывающего плеча присутствуют в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело), необязательно Fab.

5 Вариант осуществления 3. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, в котором VH2 и VL2 второго антигенсвязывающего плеча присутствуют в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело), необязательно scFv.

10 Вариант осуществления 4. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–3, в котором VH3 и VL3 третьего антигенсвязывающего плеча присутствуют в фрагменте антитела, диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело), необязательно scFv.

15 Вариант осуществления 5. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 варибельного домена тяжелой цепи (VH1) SEQ ID NO: 8 и определяющую комплементарность
20 область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи (VL1) SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 6. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–5, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, содержащую
25 аминокислотную последовательность GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность EVSKRPS
30 (SEQ ID NO: 2), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3).

Вариант осуществления 7. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–6, в котором

первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит VH1 SEQ ID NO: 8 и VL1 с SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 8. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–7, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 переменного домена тяжелой цепи (VH2) SEQ ID NO: 16 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (VL2) SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 9. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–8, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11).

Вариант осуществления 10. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит VH2 SEQ ID NO: 16 и VL2 с SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 11. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–10, в котором третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 переменного домена тяжелой цепи (VH3) SEQ ID NO: 24 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (VL3) SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 12. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–11, в котором третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), HCDR2,

содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).

Вариант осуществления 13. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–12, в котором третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит VH3 SEQ ID NO: 24 и VL3 с SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 14. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH1 SEQ ID NO: 8 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL1 SEQ ID NO: 7;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH2 SEQ ID NO: 16 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL2 SEQ ID NO: 15; и

третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH3 SEQ ID NO: 24 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL3 SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 15. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4 и 14, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, 5, 6, 1, 2, 3 соответственно;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 9, 10 и 11 соответственно; и

третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 20, 21, 22, 17, 18 и 19 соответственно.

Вариант осуществления 16. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–4, 14 и 15, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит VH1 SEQ ID NO: 8 и VL1 с SEQ ID NO: 7;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит VH2 SEQ ID NO: 16 и VL2 с SEQ ID NO: 15; и

третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит VH3 SEQ ID NO: 24 и VL3 с SEQ ID NO: 23.

- 5 Вариант осуществления 17. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–16, причем первое антигенсвязывающее плечо содержит домен кристаллизующегося фрагмента (Fc) и второе антигенсвязывающее плечо или третье антигенсвязывающее плечо содержит домен Fc.
- 10 Вариант осуществления 18. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 17, в котором домены Fc содержат одну или более мутаций, которые способствуют гетеродимеризации доменов Fc.
Вариант осуществления 19. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 18, в котором мутации выбраны из
15 T366S, L368A, T366W и Y407V (нумерация ЕС).
Вариант осуществления 20. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 17–19, в котором домены Fc дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с Fcγ-рецептором.
- 20 Вариант осуществления 21. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 20, в котором Fcγ-рецептор представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA и/или FcγRIIIB.
Вариант осуществления 22. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 20 или 21, в котором домены Fc
25 содержат одну или более мутаций, выбранных из L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).
Вариант осуществления 23. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 17–22, в котором домены Fc дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают
30 связывание Fc с белком A.
Вариант осуществления 24. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 23, в котором домен Fc содержит мутации H435R и/или Y436F (нумерация ЕС).

Вариант осуществления 25. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–24, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161) цепи CD3ε.

- 5 Вариант осуществления 26. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–25, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 1×10^{-8} до 1×10^{-7} М.

- 10 Вариант осуществления 27. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 26, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 2×10^{-8} до 4×10^{-8} М.

- 15 Вариант осуществления 28. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–27, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи ВСМА ВСМW37.

- 20 Вариант осуществления 29. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–28, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 1×10^{-10} до 1×10^{-7} М.

- Вариант осуществления 30. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 29, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М.

- 25 Вариант осуществления 31. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), и третье
30 антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на антигене созревания В-клеток (ВСМА),

причем первое антигенсвязывающее плечо содержит полипептид тяжелой цепи (HC1) и полипептид легкой цепи (LC); и

при этом триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент содержит один полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо.

Вариант осуществления 32. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 31, в котором HC1 первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Вариант осуществления 33. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 32, в котором LC первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

Вариант осуществления 34. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 32 или 33, в котором полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 35. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 31, в котором первое антигенсвязывающее плечо содержит HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 36. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), и третье антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на антигене созревания В-клеток (BCMA),

причем первое антигенсвязывающее плечо содержит полипептид тяжелой цепи (HC1) и полипептид легкой цепи (LC), при этом полипептид тяжелой цепи (HC1) дополнительно содержит второе антигенсвязывающее плечо,

при этом триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент дополнительно содержит один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо.

5 Вариант осуществления 37. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 36, в котором HC1 первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

10 Вариант осуществления 38. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 36 или 37, в котором LC первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

15 Вариант осуществления 39. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 36–38, в котором один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

20 Вариант осуществления 40. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 36, в котором первое антигенсвязывающее плечо содержит HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

25 Вариант осуществления 41. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–40, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Вариант осуществления 42. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–41, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет изотип IgG1.

30 Вариант осуществления 43. Синтетический полинуклеотид, кодирующий триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–42.

Вариант осуществления 44. Фармацевтическая композиция, содержащая триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–42 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 45. Фармацевтическая композиция по варианту

5 осуществления 44, которая дополнительно содержит второй терапевтический агент.

Вариант осуществления 46. Фармацевтическая композиция по варианту

осуществления 45, в которой второй терапевтический агент содержит агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор

10 секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их

Вариант осуществления 47. Клетка, экспрессирующая триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–42.

Вариант осуществления 48. Клетка по варианту осуществления 47, в котором клетка

15 представляет собой гибридому.

Вариант осуществления 49. Клетка по варианту осуществления 47, в которой триспецифическое антитело получено рекомбинантным способом.

Вариант осуществления 50. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества

20 триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–42 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 43–46.

Вариант осуществления 51. Способ по варианту осуществления 50, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или

25 фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.

Вариант осуществления 52. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем указанный способ включает введение в указанную клетку

эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического

30 связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–42 или

фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 43–46, при этом указанное эффективное количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.

Вариант осуществления 53. Способ по варианту осуществления 52, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.

- 5 Вариант осуществления 54. Способ по варианту осуществления 52, в котором указанное введение выполняют *ex vivo*.

Вариант осуществления 55. Способ перенаправления Т-клетки на раковые клетки, экспрессирующие ВСМА и/или GPRC5D, у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически

- 10 эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1–42 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 43–46.

Вариант осуществления 56. Способ по варианту осуществления 55, в котором указанное терапевтически эффективное количество является достаточным для

15 направления указанного Т-клеточного ответа на указанные раковые клетки.

Вариант осуществления 57. Способ по любому из вариантов осуществления 50–56, в котором рак представляет собой гемобластоз.

Вариант осуществления 58. Способ по варианту осуществления 57, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D.

- 20 Вариант осуществления 59. Способ по варианту осуществления 58, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D представляет собой множественную миелому.

Вариант осуществления 60. Способ по варианту осуществления 59, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D представляет собой тлеющую

25 множественную миелому (SMM).

Вариант осуществления 61. Способ любому из вариантов осуществления 50–60, в котором рак представляет собой рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 62. Способ по любому из вариантов осуществления 50–51, 53 и

30 55–61, в котором субъект получал предшествующую терапию.

Вариант осуществления 63. Способ по варианту осуществления 62, в котором предшествующая терапия включает в себя ингибитор протеасом, иммуномодулирующее лекарственное средство, антитело к CD38, биспецифический агент, CAR-T-терапию или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 64. Способ по любому из вариантов осуществления 50–63, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

Вариант осуществления 65. Способ по варианту осуществления 64, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или
5 средство для нацеленной противораковой терапии.

Вариант осуществления 66. Способ по варианту осуществления 65, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).

Вариант осуществления 67. Способ по варианту осуществления 64, в котором второй
10 терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 68. Способ по любому из вариантов осуществления 50–51, 53 и
15 55–67, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно, внутримышечно, внутривенно и/или подкожно.

Вариант осуществления 69. Способ по любому из вариантов осуществления 50–51, 53 и
20 55–68, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно.

Вариант осуществления 70. Способ получения триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из вариантов
осуществления 1–42, в котором указанный способ включает культивирование клетки по
любому из вариантов осуществления 47–49 и выделение указанного
25 триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента.

Вариант осуществления 71. Набор, содержащий (i) триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1–
42 и/или полинуклеотид по варианту осуществления 43 и (ii) упаковку для него.

Вариант осуществления 72. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое
30 связывается с BCMA, содержащее: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).

Вариант осуществления 73. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 72, дополнительно содержащее: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).

Вариант осуществления 74. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 72 или 73, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 75. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 72–74, содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Вариант осуществления 76. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–75, которые специфически связываются с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи BCMA BCMW37.

Вариант осуществления 77. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–76, которые специфически связываются с BCMA с аффинностью от около 1×10^{-10} до 1×10^{-7} М.

Вариант осуществления 78. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 77, которые специфически связываются с BCMA с аффинностью от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М.

Вариант осуществления 79. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–78, которые представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.

Вариант осуществления 80. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–79, которые являются рекомбинантными.

Вариант осуществления 81. Антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 72–80, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 82. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–81, которые представляют собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Вариант осуществления 83. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–82, которые представляют собой изотип IgG1 или IgG4.

5 Вариант осуществления 84. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–83 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 85. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 84, которая дополнительно содержит второй терапевтический агент.

10 Вариант осуществления 86. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 85, в которой второй терапевтический агент содержит агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.

15 Вариант осуществления 87. Клетка, экспрессирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–83.

Вариант осуществления 88. Клетка по варианту осуществления 87, в котором клетка представляет собой гибридому.

Вариант осуществления 89. Клетка по варианту осуществления 87, в которой антитело получено рекомбинантным способом.

20 Вариант осуществления 90. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 72–83 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 84–86.

25 Вариант осуществления 91. Способ по варианту осуществления 90, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.

Вариант осуществления 92. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем указанный способ включает введение в указанную клетку эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из
30 вариантов осуществления 72–83 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 84–86, при этом указанное эффективное количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.

Вариант осуществления 93. Способ по варианту осуществления 92, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.

Вариант осуществления 94. Способ по варианту осуществления 92, в котором
5 указанное введение выполняют *ex vivo*.

Вариант осуществления 95. Способ по любому из вариантов осуществления 90–94, в котором рак представляет собой гемобластоз.

Вариант осуществления 96. Способ по варианту осуществления 95, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией ВСМА.

10 Вариант осуществления 97. Способ по варианту осуществления 96, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА представляет собой множественную миелому.

Вариант осуществления 98. Способ по варианту осуществления 97 в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА представляет собой тлеющую множественную миелому (SMM).

15 Вариант осуществления 99. Способ любому из вариантов осуществления 90–98, в котором рак представляет собой рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 100. Способ по любому из вариантов осуществления 90–91, 93 и 95–99, в котором субъект получал предшествующую терапию.

20 Вариант осуществления 101. Способ по варианту осуществления 100, в котором предшествующая терапия включает в себя ингибитор протеасом, иммуномодулирующее лекарственное средство, антитело к CD38, биспецифический агент, CAR-T-терапию или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 102. Способ по любому из вариантов осуществления 90–101,
25 дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

Вариант осуществления 103. Способ по варианту осуществления 102, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.

Вариант осуществления 104. Способ по варианту осуществления 103, в котором
30 химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).

Вариант осуществления 105. Способ по варианту осуществления 104, в котором второй терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных

точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 106. Способ по любому из вариантов осуществления 90–91, 93 и 95–105, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или

5 фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно и/или подкожно.

Вариант осуществления 107. Способ по любому из вариантов осуществления 90–91, 93 и 95–106, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно.

10 Вариант осуществления 108. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 72–83, в котором указанный способ включает культивирование клетки по любому из вариантов осуществления 87–89 и выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 109. Синтетический полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–83.

Вариант осуществления 110. Набор, содержащий (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 72–83 и/или полинуклеотид по варианту осуществления 109 и (ii) упаковку для него.

Вариант осуществления 111. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

а) первый участок тяжелой цепи (HC1), содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH);

б) участок легкой цепи (LC), содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL); и

25 в) второй участок тяжелой цепи (HC2), содержащий второй домен VH,

где

(i) VH HC1 и домены VL LC образуют первый антигенсвязывающий сайт, который связывает первый антиген,

(ii) домен VH HC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который связывает второй антиген,

30 (iii) HC1 или HC2 дополнительно содержит третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт, который связывает третий антиген,

(iv) каждый из HC1 и HC2 необязательно содержит домен кристаллизующегося фрагмента (Fc), содержащий домен CH2–CH3; и

причем первый антиген представляет собой кластер дифференцировки 3 (CD3), и (v) второй антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA), а третий антиген представляет собой член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPRC5D); или

- 5 (vi) второй антиген представляет собой член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPRC5D), а третий антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA).

Вариант осуществления 112. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, в котором HC2 содержит
10 третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт, который связывает третий антиген.

Вариант осуществления 113. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 112, в котором HC2 содержит, от N к С-концу, второй домен VH, образующий второй антигенсвязывающий сайт, домен Fc,
15 первый линкер (L1) и третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт.

Вариант осуществления 114. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–113, в котором HC2 содержит второй домен VH, образующий второй антигенсвязывающий сайт,
20 который связывается с GPRC5D, а HC2 дополнительно содержит третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт, который связывает BCMA.

Вариант осуществления 115. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, в котором HC1 содержит третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт, который связывает
25 третий антиген.

Вариант осуществления 116. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 115, в котором HC1 содержит, от N к С-концу, первый VH, образующий первый антигенсвязывающий сайт, домен CH1, домен Fc, первый линкер (L1) и третий домен VH, образующий третий
30 антигенсвязывающий сайт.

Вариант осуществления 117. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111, 115 и 116, в котором HC2 содержит второй домен VH, образующий второй антигенсвязывающий

сайт, который связывается с ВСМА, а HC1 дополнительно содержит третий домен VH, образующий третий антигенсвязывающий сайт, который связывает GPRC5D.

Вариант осуществления 118. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–117, в котором
5 VH HC1 и VL LC образуют первый антигенсвязывающий сайт, содержащий антигенсвязывающий фрагмент (Fab), содержащий первый антигенсвязывающий сайт.

Вариант осуществления 119. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–118, в котором
10 VH HC2 образует одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий второй антигенсвязывающий сайт.

Вариант осуществления 120. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–119, в котором третий VH образует одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий третий антигенсвязывающий сайт.

15 Вариант осуществления 121. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–120, в котором Fc-домены HC1 и HC2 содержат одну или более различных мутаций, которые способствуют гетеродимеризации.

Вариант осуществления 122. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 121, в котором Fc-домен HC1
20 содержит мутации T366S, L368A и Y407V (нумерация ЕС), а Fc-домен HC2 содержит мутацию T366W (нумерация ЕС).

Вариант осуществления 123. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 121, в котором Fc-домен HC2
25 содержит мутации T366S, L368A и Y407V (нумерация ЕС), а Fc-домен HC1 содержит мутацию T366W (нумерация ЕС).

Вариант осуществления 124. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–123, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 дополнительно содержат одну или более мутаций, которые
30 снижают связывание Fc с Fcγ-рецептором.

Вариант осуществления 125. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 124, в котором Fcγ-рецептор представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA и/или FcγRIIIB.

Вариант осуществления 126. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 124 или 125, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 содержат одну или более мутаций, выбранных из L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).

- 5 Вариант осуществления 127. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 126, в котором каждый Fc-домен HC1 и HC2 содержит мутации L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).

- 10 Вариант осуществления 128. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–127, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с белком A.

Вариант осуществления 129. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 128, в котором домен Fc HC1 и/или HC2 содержит мутации H435R и/или Y436F (нумерация ЕС).

- 15 Вариант осуществления 130. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 129, в котором домен Fc HC1 содержит мутации H435R и Y436F (нумерация ЕС).

- 20 Вариант осуществления 131. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 113–114 и 116–130, в котором первый линкер (L1) содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 127–157 и 163.

- 25 Вариант осуществления 132. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 131, в котором первый линкер (L1) содержит аминокислотную последовательность GGSEKSSGSGSESKSTGGS (SEQ ID NO: 25) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((G4S)₄, SEQ ID NO: 163).

- 30 Вариант осуществления 133. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–132, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6).

Вариант осуществления 134. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–133, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность EVSKRPS (SEQ ID NO: 2), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3).

Вариант осуществления 135. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–134, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD3, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 136. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–135, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD3, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Вариант осуществления 137. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–136, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14).

Вариант осуществления 138. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–137, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11).

Вариант осуществления 139. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–138, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает GPRC5D, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 140. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–139, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает GPRC5D, содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 141. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–140, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает BCMA, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).

Вариант осуществления 142. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–141, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает BCMA, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).

Вариант осуществления 143. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–142, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает BCMA, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариант осуществления 144. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–143, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который связывает BCMA, содержит

вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

5 Вариант осуществления 145. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 119–144, в котором scFv содержит, от N- к C-концу, VH, второй линкер (L2) и VL (VH-L2-VL); или VL, L2 и VH (VL-L2-VH).

Вариант осуществления 146. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 119–145, в котором scFv содержит, от N- к C-концу, VL, L2 и VH (VL-L2-VH).

10 Вариант осуществления 147. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 145 или 146, в котором второй линкер (L2) содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 127–157 и 163.

15 Вариант осуществления 148. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 145–147, в котором L2 содержит аминокислотную последовательность GGSEKSSGSGSESKSTGGS (SEQ ID NO: 25).

20 Вариант осуществления 149. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–148, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161) цепи CD3ε.

Вариант осуществления 150. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–149, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 1×10^{-8} до 1×10^{-7} М.

25 Вариант осуществления 151. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 150, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 2×10^{-8} до 4×10^{-8} М.

30 Вариант осуществления 152. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–151, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи ВСМА ВСМW37.

Вариант осуществления 153. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 152, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 1×10^{-10} до 1×10^{-7} М.

Вариант осуществления 154. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 153, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М.

Вариант осуществления 155. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–154, которые представляют собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Вариант осуществления 156. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 111–155, которые представляют собой изотип IgG1.

Вариант осуществления 157. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, в котором HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Вариант осуществления 158. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111 или 157, в котором LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

Вариант осуществления 159. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, 157 или 158, в котором HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 160. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, в котором HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

Вариант осуществления 161. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111 или 160, в котором LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

Вариант осуществления 162. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 111, 160 или 161, в котором HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

Изобретение также может быть определено следующими пронумерованными пунктами.

Пункт 1. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- а) первую тяжелую цепь (HC1);
- б) легкую цепь (LC); и
- с) вторую тяжелую цепь (HC2);

где

- (i) HC1 и LC образуют первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с первым антигеном,
- (ii) HC2 содержит второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается со вторым антигеном,
- 5 (iii) HC1 или HC2 дополнительно содержит третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает третий антиген,
- (iv) каждый из HC1 и HC2 содержит домен кристаллизующегося фрагмента (Fc), содержащий домен CH2–CH3; и
- причем первый антиген представляет собой кластер дифференцировки 3 (CD3), и
- 10 (v) второй антиген представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA), а третий антиген представляет собой член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D); или
- (vi) второй антиген представляет собой член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), а третий антиген представляет собой антиген созревания
- 15 В-клеток (BCMA).

Пункт 2. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, в котором HC2 содержит третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает третий антиген.

- 20 Пункт 3. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 2, в котором HC2 содержит, от N к С-концу, второй антигенсвязывающий сайт, домен Fc, линкер и третий антигенсвязывающий сайт.

- Пункт 4. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–3, в котором HC2 содержит второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с GPCR5D, а HC2 дополнительно содержит третий
- 25 антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с BCMA.

Пункт 5. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, в котором HC1 содержит третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает третий антиген.

- 30 Пункт 6. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 5, в котором HC1 содержит, от N к С-концу, переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с первым антигенсвязывающим сайтом, домен CH1, домен Fc, линкер и третий антигенсвязывающий сайт.

Пункт 7. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1, 5 и 6, в котором HC2 содержит второй антигенсвязывающий

сайт, который специфически связывается с ВСМА, а HC1 дополнительно содержит третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с GPRC5D.

Пункт 8. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–7, в котором первый антигенсвязывающий сайт содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab).

Пункт 9. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–8, в котором второй антигенсвязывающий сайт содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Пункт 10. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–9, в котором третий антигенсвязывающий сайт содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Пункт 11. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–10, в котором Fc-домены HC1 и HC2 содержат одну или более различных мутаций, которые способствуют гетеродимеризации.

Пункт 12. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 11, в котором Fc-домен HC1 содержит мутации T366S, L368A и Y407V (нумерация ЕС), а Fc-домен HC2 содержит мутацию T366W (нумерация ЕС).

Пункт 13. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 11, в котором Fc-домен HC2 содержит мутации T366S, L368A и Y407V (нумерация ЕС), а Fc-домен HC1 содержит мутацию T366W (нумерация ЕС).

Пункт 14. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–13, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с Fcγ-рецептором.

Пункт 15. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 14, в котором Fcγ-рецептор представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA и/или FcγRIIB.

Пункт 16. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 14 или 15, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 содержат одну или более мутаций, выбранных из L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).

Пункт 17. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 16, в котором каждый Fc-домен HC1 и HC2 содержит мутации L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).

Пункт 18. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–17, в котором домены Fc HC1 и/или HC2 дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с белком А.

5 Пункт 19. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 18, в котором домен Fc HC1 и/или HC2 содержит мутации H435R и/или Y436F (нумерация ЕС).

Пункт 20. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 19, в котором домен Fc HC1 содержит мутации H435R и Y436F (нумерация ЕС).

10 Пункт 21. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 3 и 5–18, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность GGSEGGKSSGSGSESKSTGGS (SEQ ID NO: 25) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((G4S)4, SEQ ID NO: 163).

15 Пункт 22. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–21, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и CDR3
20 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6).

Пункт 23. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–22, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1
25 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность EVSKRPS (SEQ ID NO: 2), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3).

30 Пункт 24. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–23, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Пункт 25. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–24, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который

специфически связывает CD3, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Пункт 26. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–25, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14).

Пункт 27. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–26, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11).

Пункт 28. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–27, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Пункт 29. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–28, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Пункт 30. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–29, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает BCMA, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).

- Пункт 31. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–30, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает ВСМА, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).
- Пункт 32. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–31, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает ВСМА, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.
- Пункт 33. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–32, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает ВСМА, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
- Пункт 34. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–33, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 160) цепи CD3ε.
- Пункт 35. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 34, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью около $2,5 \times 10^{-8}$ М.
- Пункт 36. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 34, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью около $3,1 \times 10^{-8}$ М.
- Пункт 37. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–36, в котором второй или третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 161)) цепи ВСМА ВСМW37.
- Пункт 38. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 37, в котором второй антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью около $2,1 \times 10^{-10}$ М.

Пункт 39. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 37, в котором второй антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью около $8,4 \times 10^{-10}$ М.

5 Пункт 40. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–39, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Пункт 41. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–40 имеет изотип IgG1.

10 Пункт 42. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, в котором HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Пункт 43. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1 или 42, в котором LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

15 Пункт 44. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, 42 или 43, в котором HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Пункт 45. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, в котором HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

20 Пункт 46. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1 или 45, в котором LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

25 Пункт 47. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 1, 45 или 46, в котором HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

Пункт 48. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- 30 а) первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с CD3,
 б) второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с GPRC5D, и
 в) третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с ВСМА.

Пункт 49. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 48, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GDSVFNNNAAWS (SEQ

ID NO: 4), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6).

5 Пункт 50. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 48 или 49, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность EVSKRPS (SEQ ID NO: 2), и CDR3 легкой цепи, содержащую

10 аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3).

Пункт 51. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–50, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

15 Пункт 52. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–51, в котором первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Пункт 53. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент

20 по любому из пунктов 48–52, в котором второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую

25 аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14).

Пункт 54. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–53, в котором второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность

30 RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11).

Пункт 55. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–54, в котором второй антигенсвязывающий сайт, который

специфически связывает GPRC5D, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Пункт 56. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–55, в котором второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Пункт 57. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–56, в котором третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает BCMA, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).

Пункт 58. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–57, в котором третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает BCMA, содержит: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).

Пункт 59. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–58, в котором третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает BCMA, содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Пункт 60. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–59, в котором третий антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает BCMA, содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Пункт 61. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–60, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 160) цепи CD3ε.

Пункт 62. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 61, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью около $2,5 \times 10^{-8}$ М.

- 5 Пункт 63. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 61, в котором первый антигенсвязывающий сайт специфически связывается с CD3 с аффинностью около $3,1 \times 10^{-8}$ М.

- Пункт 64. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–63, в котором третий антигенсвязывающий сайт
10 специфически связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 161)) цепи ВСМА ВСМВ37.

Пункт 65. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 64, в котором третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью около $2,1 \times 10^{-10}$ М.

- 15 Пункт 66. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по пункту 64, в котором третий антигенсвязывающий сайт специфически связывается с ВСМА с аффинностью около $8,4 \times 10^{-10}$ М.

Пункт 67. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–66, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

- 20 Пункт 68. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 48–67 имеет изотип IgG1.

Пункт 69. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- 25 а) первую тяжелую цепь (HC1);
б) легкую цепь (LC); и
с) вторую тяжелую цепь (HC2);

причем HC1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

- 30 Пункт 70. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

- а) первую тяжелую цепь (HC1);
б) легкую цепь (LC); и
с) вторую тяжелую цепь (HC2);

причем HC1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 и HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

- Пункт 71. Фармацевтическая композиция, содержащая триспецифическое антитело или
- 5 триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–70 и фармацевтически приемлемый носитель.
- Пункт 72. Клетка, экспрессирующая триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–70.
- Пункт 73. Клетка по пункту 72, которая представляет собой гибридому.
- 10 Пункт 74. Клетка по пункту 72, в которой триспецифическое антитело получено рекомбинантным способом.
- Пункт 75. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пунктов 1–70
- 15 или фармацевтической композиции по пункту 71.
- Пункт 76. Способ по пункту 75, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.
- Пункт 77. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем
- 20 указанный способ включает введение в указанную клетку эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пунктов 1–70 или фармацевтической композиции по пункту 71, при этом указанное эффективное количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.
- 25 Пункт 78. Способ по пункту 77, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.
- Пункт 79. Способ по пункту 77, в котором указанное введение выполняют *ex vivo*.
- Пункт 80. Способ перенаправления Т-клетки на раковые клетки, экспрессирующие
- 30 BCMA и/или GPRC5D, у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пунктов 1–70 или фармацевтической композиции по пункту 71.

Пункт 81. Способ по пункту 80, в котором указанное терапевтически эффективное количество является достаточным для направления указанного Т-клеточного ответа на указанные раковые клетки.

Пункт 82. Способ по любому из пунктов 75–81, в котором рак представляет собой гемобластоз.

Пункт 83. Способ по пункту 82, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией BCMA и/или GPRC5D.

Пункт 84. Способ по пункту 83, в котором В-клеточный рак с экспрессией BCMA и/или GPRC5D представляет собой множественную миелому.

Пункт 85. Способ по любому из пунктов 75–84, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

Пункт 86. Способ по пункту 85, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или средство для нацеленной противораковой терапии.

Пункт 87. Способ по пункту 86, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).

Пункт 88. Способ получения триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пунктов 1–70, в котором указанный способ включает культивирование клетки по любому из пунктов 72–74 и выделение указанного триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента.

Пункт 89. Синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, LC и/или HC2 триспецифического антитела или триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 1–70.

Пункт 90. Набор, содержащий (i) триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пунктов 1–70 и/или полинуклеотид по пункту 89 и (ii) упаковку для него.

Пункт 91. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с BCMA, содержащее: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).

Пункт 92. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 91, дополнительно содержащее: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).

Пункт 93. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 91 или 92, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Пункт 94. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–93, содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Пункт 95. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–94, которые специфически связываются с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 161)) цепи ВСМА ВСМW37.

Пункт 96. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 95, которые специфически связываются с ВСМА с аффинностью около $2,1 \times 10^{-10}$ М.

Пункт 97. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пункту 95, которые специфически связываются с ВСМА с аффинностью около $8,4 \times 10^{-10}$ М.

Пункт 98. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–97, которые представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.

Пункт 99. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–98, которые являются рекомбинантными.

Пункт 100. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–99, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

Пункт 101. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–100, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Пункт 102. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–101, которые имеют изотип IgG1 или IgG4.

Пункт 103. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–102 и фармацевтически приемлемый носитель.

Пункт 104. Клетка, экспрессирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–102.

Пункт 105. Клетка по пункту 104, которая представляет собой гибридому.

Пункт 106. Клетка по пункту 104, в которой антитело получено рекомбинантным способом.

5 Пункт 107. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов 91–102 или фармацевтической композиции по пункту 103.

10 Пункт 108. Способ по пункту 107, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.

Пункт 109. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем указанный способ включает введение в указанную клетку эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов 91–102 или фармацевтической композиции по пункту 103, при этом указанное эффективное
15 количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.

Пункт 110. Способ по пункту 109, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.

20 Пункт 111. Способ по пункту 109, в котором указанное введение выполняют *ex vivo*.

Пункт 112. Способ по любому из пунктов 107–111, в котором рак представляет собой гемобластоз.

Пункт 113. Способ по пункту 112, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией ВСМА.

25 Пункт 114. Способ по пункту 113, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА представляет собой множественную миелому.

Пункт 115. Способ по любому из пунктов 107–114, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

30 Пункт 116. Способ по пункту 115, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или средство для нацеленной противораковой терапии.

Пункт 117. Способ по пункту 116, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).

Пункт 118. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов 91–102, в котором указанный способ включает культивирование клетки по любому из пунктов 104–106 и выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

- 5 Пункт 119. Синтетический полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–102.

Пункт 120. Набор, содержащий (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 91–102 и/или полинуклеотид по пункту 119 и (ii) упаковку для него.

10 ПРИМЕРЫ

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем документе. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения и которые можно вносить без выхода за рамки объема изобретения.

20 Пример 1. Проверка мишени

Научное обоснование разработки триспецифических антител к ВСМА х GPRC5D х CD3 заключается в эффективном уничтожении злокачественных клональных плазматических клеток костного мозга и других органов больных ММ. Это должно быть достигнуто путем введения триспецифического антитела, способного одновременно связываться с сорцептором TCR CD3ε, экспрессируемым на эффекторных Т-клетках, и с целевыми белками, GPRC5D и ВСМА, экспрессируемыми на клетках В-клеточной линии, преимущественно плазмобластах и зрелых плазматических клетках (8). Путем сближения Т-клеток и раковых клеток триспецифические антитела к ВСМА х GPRC5D х CD3 способствуют активации Т-клеток с последующим лизисом раковых клеток, опосредованным секретиремым перфорином и различными гранзимами, находящимися в секреторных везикулах CTL (ФИГ. 1Б).

Преимущество этих подходов, относящееся к механизму действия, включает их способность сближать CD3+ Т-клетки с плазматическими клетками без учета

специфичности TCR или зависимости от молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности антигенпрезентирующих клеток для активации, обходя известные MoR для терапии на основе Т-клеток посредством угнетения молекул класса МНС.

5 *Выбор/проверка мишени*

Потенциальный успех Т-клеточных терапевтических подходов основан на присутствии антигенов, обнаруженных конкретно на поверхности опухолевых клеток. Из наиболее распространенных маркеров плазмочитов BCMA и GPRC5D проявляли селективные профили экспрессии и показали концепции клинического подтверждения (PoC) для обеих мишеней.

BCMA (также известный как CD269; название гена TNFRSF17) представляет собой 20 кДа мембранный белок типа I, который экспрессируется исключительно на клеточной линии В-клеток, играет важнейшую роль в созревании В-клеток и селективно индуцируется во время дифференцировки плазматических клеток (9,10).

15 BCMA связывается с 2 лигандами: APRIL (CD256) и BAFF (CD257; 11). Рецептор BCMA представляет собой 184-аминокислотный белок с 54-аминокислотным внеклеточным доменом. В дополнение к экспрессии на клеточной поверхности, BCMA расщепляется с помощью активности гамма-секретазы в трансмембранном домене, образуя ~6 кДа растворимый фрагмент белка BCMA (12). В образцах сыворотки крови

20 пациентов с ММ измерялись высокие уровни растворимого BCMA (13), и они коррелировали с количеством плазматических клеток (14). Ингибирование гамма-секретазы приводит к значительному увеличению экспрессии поверхностного белка BCMA в первичных В-клетках человека (12) и клеточных линиях ММ и моноклеарных клетках костного мозга (13). BCMA создавали как подтвержденную

25 мишень в ММ с несколькими одобренными терапевтическими средствами (15–17).

GPRC5D — это 7-трансмембранный рецепторный белок, который на основании оценки гомологии последовательностей относится к G-белок-связанным рецепторам (GPCR) типа C. GPRC5D представляет собой орфанный рецептор, лиганд и сигнальные механизмы которого еще не идентифицированы. Рецептор GPRC5D представляет собой

30 белок из 354 аминокислот, имеющий типичную 7-трансмембранную структуру с коротким 27-аминокислотным N-концом в отличие от других членов семейства (18). мРНК GPRC5D преимущественно экспрессируется в клетках с фенотипом плазматических клеток и также экспрессируется во всех злокачественных плазматических клетках субъектов с ММ (19–23). Уровень экспрессии GPRC5D у

больных ММ хорошо коррелирует с нагрузкой плазматических клеток и генетическими aberrациями, такими как делеция Rb-1 (19).

Экспрессия мишени

Экспрессия мРНК и белков BCMA и GPRC5D ограничена определенными типами клеток. BCMA экспрессируется на зрелых В-клетках и плазматических клетках, в то время как экспрессия GPRC5D на иммунных клетках ограничена только фенотипом плазматических клеток. Помимо экспрессии на иммунных клетках, мРНК GPRC5D экспрессируется в твердых кератинизированных тканях. Уровень мРНК GPRC5D на CD138+ клетках костного мозга пациентов с миеломой был повышен по сравнению с нормальными CD138+ клетками здоровых людей, а высокие уровни мРНК BCMA в основном ограничивались зрелыми В-клетками, включая плазматические клетки (10, 13, 19, 21–26). Экспрессия белков BCMA (13, 25) и GPRC5D (19, 21, 22) в нормальных тканях при иммуногистохимическом (ИHC) окрашивании обнаруживалась преимущественно в плазматических клетках. Кроме того, экспрессия GPRC5D была обнаружена и в твердых кератинизированных тканях, таких как волосные фолликулы (27). Мононуклеарные клетки костного мозга пациентов с ММ демонстрировали клональную гетерогенность по экспрессии BCMA и GPRC5D (21, 22). Подробное описание профилей целевой экспрессии представлено в примере 2.

Важно отметить, что селективная экспрессия BCMA и GPRC5D на CD138+ клетках костного мозга ММ и низкий риск мишенеспецифической внеопухолевой токсичности определяет их как потенциальные мишени для Т-клеточно-опосредованной терапии (10, 13, 20–22).

Пример 2. Дизайн молекулы, последовательность и структура триспецифического антитела BGCB463

BGCB463 представляет собой триспецифическое антитело к иммуноглобулину (Ig) G1, которое может связываться одновременно или индивидуально с эпсилон-субъединицей рецепторного комплекса кластера дифференцировки 3 (CD3ε) на Т-лимфоцитах (Т-клетках), и GPRC5D (член D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов), и BCMA (антиген созревания В-клеток, TNFRSF17) на опухолевых клетках. Антитело имеет мутации L234A, L235A и D265S (в соответствии с нумерацией ЕС) в константной области (Fc), отменяющие взаимодействие с Fc-рецепторами, а гетеродимеризация усилена с помощью мутаций платформы выступ-вопадину. Цепь «впадины» антитела к CD3ε также содержит RF-мутации (H435R,

Y436F; в соответствии с нумерацией ЕС) для нарушения связывания белка А с мономерными и гомодимеризованными цепями впадины. Молекула содержит область Fab антитела к CD3ε на цепи «впадина, RF» и v-область scFv антитела к GPRC5D на цепи «выступ». Триспецифическое антитело было разработано для оценки терапевтического потенциала двойного нацеливания на опухоль GPRC5D и BCMA и CD3 для перенаправления Т-клеток. Пример BGCB463 представлен на ФИГ. 1А.

Триспецифическое антитело BGCB463 было получено путем совместной экспрессии тяжелой цепи А (HC) и легкой цепи (LC) антитела к CD3 с тяжелой цепью В антитела к GPRC5D, антитела к BCMA. Вариабельная область антитела к CD3 была обнаружена путем иммунизации трансгенных гуманизированных крыс [OmniRat (OMT™)] рекомбинантным белком CD3ε. Вариабельная область антитела к GPRC5D (VR000038761), представленная в BGCB463, получена из mAb GC5B680, созданного путем иммунизации трансгенных гуманизированных мышей [Ablexis] ДНК, кодирующей GPRC5D. Родительская v-область (VR000029832) содержала мотив «NSS» в области HC-каркаса 3, который представлял риск N-связанного гликозилирования и являлся мутацией из зародышевой линии IGHV2-26*01. Для устранения риска N-связанного гликозилирования сайт подвергли обратной мутации в зародышевую последовательность «STS», что привело к образованию конечной вариабельной области VR000038761. Вариабельная область антитела к BCMA (VR000003260), представленная в BGCB463, получена из mAb BCMB519, созданного путем иммунизации трансгенных гуманизированных мышей [Ablexis] рекомбинантным белком BCMA. В эту v-область не вносили никаких дополнительных модификаций. V-области как антитела к GPRC5D, так и антитела к BCMA были оформлены в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) в конечной молекуле.

Аминокислотная последовательность тяжелой и легкой цепей BGCB463, выведенная из последовательности кДНК BGCB463 и подтвержденная с помощью пептидного картирования и масс-спектрометрии, приведена ниже (таблица 5). В каждой цепи жирным шрифтом выделены и подчеркнуты 3 области, определяющие комплементарность (CDR), указанные в соответствии с нумерацией ABM. Остаток Gln в положении 1 тяжелой цепи 1 BGCB463, остаток Gln в положении 1 легкой цепи BGCB463 и Asp в положении 1 тяжелой цепи 2 BGCB463 составляют N-конец зрелых цепей. Обе тяжелые цепи, содержащие AAS IgG1 BGCB463, имеют следующие точечные мутации: L234A, L235A и D265S. Тяжелая цепь 1 из BGCB463 обладает мутациями «впадины»: T366S, L368A, Y407V и RF-мутациями: H435R, Y436F, в то

время как тяжелая цепь 2 имеет мутацию «выступа»: T366W. Мутации «выступы-во-впадины» способствуют гетеродимеризации Fc. «RF-мутации» нарушают связывание с белком А. Мутации для сайленсинга рецептора FcγR (AAS) и мутации «выступы-во-впадины» подчеркнуты в последовательностях ниже.

5

Таблица 5. Аминокислотная последовательность BGCB463

Площадь	Последовательность AA	SEQ ID NO:
Легкая цепь 1	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCT GTGSSNIG TYKFV SWYQQ HPDKAPKVLL YEVS KRPSGV SSRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDQADYHC YSYAGSGTLL FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	27
Тяжелая цепь 1	QVQLQQSGPR LVRPSQTLSTL TCAIS GDSVF NNNA AWSWIR QSPSRGLEWL GRTYYRSKWL YD YAVSVKSR ITVNPDTSRN QFTLQLNSVT PEDTALYYCA RGYSSSFDYW GQGTLLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE AAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVV SVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSL SC AVK GFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLT VDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRT QKSLSLSPGK	26
Тяжелая цепь 2	DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS ISC RSSQSLV HSDGNTYLSW LQORPGQPPR LLIY KISNRE FG VPDRFSGS GAGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC MOATQFP HT FGQGTKLE IKGGSEGKSS GSGSESKSTG GSQVTLKESG PVLVKPTETL TLTCTV SGFS LTNIRMSVSW IRQPPGKALE WLA HIFSNDK KS YSTSLKSR LTISRDTSKS QVVLTLTNVD PVDATATYYCA R MRLPYGMDV WGQGTITVTVS SEPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG PSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV SVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LW CLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGKGGSEGKS SSGSESKST GGSEIVLTQS PGTSLSPGE RATLSC CRASQ SISSSFLT WY QQKPGQAPRL LIY GASSRAT GIPDRFSGGG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YC QHYGSSPM YTF GQGTKLE IKGGSEGKSS GSGSESKSTG GSEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAAS GFT FSSYAMS WVR QAPGKGLEWV SAISGSGGST YY ADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAK DEGYSSGHYY GMDV WGQGT VTVSS	28

Пример 3. Оценка риска иммуногенности триспецифического антитела BGCB463

Последовательности триспецифических антител были проанализированы на предмет потенциальной иммуногенности с использованием скорректированных показателей Т-регуляторных клеток (T_{reg}) из программы прогнозирования

10

иммуногенности EpiVax Epimatrix *in silico* (таблица 6). Программа EpiVax рассчитывает потенциал связывания с наиболее распространенными молекулами HLA в каждом из «супертипов». В отчете представлены результаты, репрезентативные для >90% человеческих популяций по всему миру, без необходимости тестирования каждого гаплотипа в отдельности. Оценка EpiVax рассчитывается путем суммирования оценок EpiMatrix всех предсказанных Т-клеточных эпитопов, содержащихся в данной последовательности белка, с поправкой на ожидаемое содержание Т-клеточных эпитопов и длину белка. Интерпретация оценки EpiVax представлена ниже: оценка EpiVax < -20 представляет собой «идеальный» вариант; оценка EpiVax от -20 до +20 представляет собой «приемлемый» вариант; и оценка EpiVax > +20 представляет собой «неприемлемый» вариант.

Таблица 6. Оценка иммуногенности для BGCB463

BGCB463 Информация о цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области	SEQ ID NO:	EpiVax оценка	Интерпретация оценки EpiVax
VL легкой цепи 1 (CD3B376)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGT YKFVSWYQQHPDKAPKVLLEYVSKRPSG VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYH CVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	7	-44,88	Идеальный
VH тяжелой цепи 1 (CD3B376)	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVF NNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYYRSK WLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLN SVTPEDTALYYCARGYSSFDYWGQGTLLV TVSS	8	+65,28	Неприемлемый
VL N-концевого scFv тяжелой цепи 2 (GC5B680 N68S, S69T)	DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVH SDGNTYLSWLQQRPGQPPRLIYKISNRFF GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQATQFPHTFGQGTKLEIK	15	-3,12	Приемлемый
VH N-концевого scFv тяжелой цепи 2 (GC5B680 N68S, S69T)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLT NIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDKES YSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPV DTATYYCARMRLPYGMDVWGQGTTVTV SS	16	-11,65	Приемлемый
VL C-концевого scFv тяжелой цепи 2 (BCMB519)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISS FLTWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDR FSGGGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQHY GSSPMYTFGQGTKLEIK	23	-52,88	Идеальный
VH C-концевого scFv тяжелой цепи 2 (BCMB519)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWG QGTTVTVSS	24	-54,35	Идеальный

Пример 4. Определение характеристик связывания триспецифического антитела BGCB463

Часть 1. Материалы и методы

Клеточные линии

5 Для определения характеристик связывания GPRC5D и BCMA использовали клеточные линии, полученные из множественной миеломы H929 и MM.1R. Кроме того, был сгенерирован набор CRISPR-нокаутов H929 (моноклональная линия D11 H929-GPRC5D-KO), H929-BCMA-KO и H929-GPRC5D/BCMA-KO. Аналогичные нокауты MM.1R были созданы также для оценки связывания GPRC5D и BCMA. Все линии были
10 получены из внутренних источников (ABS) и культивировались на полной среде RPMI, состоящей из среды RPMI 1640, добавки GlutaMAX™, HEPES, термоинактивированного (HI) FBS, неосновных аминокислот (NEAA), пирувата натрия и 2-ME (все ThermoFisher).

Были использованы моноклональные клеточные линии K562,
15 сверхэкспрессирующие GPRC5D человека (моноклон H1B5) и BCMA человека (моноклон H1/B5). Кроме того, использовали клетки K562-Fluc-GFP, экспрессирующие GPRC5D (моноклон M1C11) и BCMA яванского макака. Обе клеточные линии поддерживали в IMDM, 10% FBS, 2 mM глутамина и 2 мг/мл G418 (все ThermoFisher).

20 *Клеточное связывание (FACS)*

BGCB463.003 и BGCB463.004 или B23B251 (контроль изотипа для IgG1-AAS) использовали либо как немеченые молекулы, либо непосредственно конъюгировали с Alexa Fluor 647. BGCB463.003 экспрессировали посредством транзientной трансфекции, а BGCB463.004 — из пула стабильных трансфекций.

25 Для определения связывания BGCB463 с пан-Т-клетками человека и яванского макака отбирали клетки от трех доноров-людей (Nemasare), быстро размораживали, ресуспендировали и аликвотировали в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Затем клетки промывали, в случае необходимости блокировали Fc (Innovex) и окрашивали красителем для определения жизнеспособности (Invitrogen).
30 BGCB463 и его соответствующий изотип (B23B251) разводили в полной среде до начальной концентрации 2 мкМ и последовательных разведений 1 : 3 в двух повторностях для кривой доза-ответ. Клетки инкубировали с молекулами при 4 °C или 37 °C в течение 1 часа. При необходимости также проводили инкубацию с 90% человеческой сывороткой (Sigma), как описано выше.

Для определения возможной интерференции растворимого BCMA (sBCMA) получали сыворотки пациентов с известной концентрацией из BDS (1 пул) и инкубировали с клетками BGCB463 и H929. Для инкубации сыворотки пациента разводили нормальными сыворотками для анализа sBCMA при сохранении 90% общей сыворотки человека.

С помощью программы ForeCyt проводили гейтирование синглетных живых популяций и рассчитывали медианную интенсивность флуоресценции (MeИФ) канала AlexaFluor 647 для каждого образца. Необработанные данные экспортировали в Excel (Office 365, Microsoft), где дубликаты усредняли и далее анализировали в программе Prism (v. 8.0, Graphpad). При необходимости вычитали фон изотипа. В настоящем документе графики зависимости доза-ответ и EC_{50} рассчитывали для каждой молекулы для каждого донора. Наконец, средние значения всех трех доноров каждого соответствующего вида рассчитывали для получения среднего значения EC_{50} для видов.

Связывание с течением времени

Для оценки кинетического связывания GPRC5D и BCMA с течением времени использовали клеточные линии H929 и MM.1R KO, упомянутые выше. FACS-анализ связывания BGCB463 с указанными клеточными линиями проводили при варьировании конечных концентраций на основе кривых доза-ответ связывания при 37 °C в течение 1 часа таким образом, чтобы хотя бы одна из концентраций была близка к EC_{50} . Выбирали три конечные концентрации с 5-кратной разницей, все с инкубацией в течении 1 ч, 3 ч, 5 ч и 24 ч. Связывание BGCB463 оценивали в полном RPMI при 37 °C.

BGCB463 или сопутствующий изотипический контроль B23B251 сначала разводили в полной RPMI при 2-кратной концентрации и инкубировали при 37 °C. Затем клетки собирали и подсчитывали с использованием Vi-Cell XR (Beckman Coulter), а затем добавляли к мастер-планшету с глубокими лунками с получением ~1E5 клеток в момент времени. В каждый момент времени клетки удаляли и переносили в круглодонный 96-луночный планшет, содержащий холодный буфер FACS (буфер для окрашивания, содержащий 0,2% BSA (BD) + 2 mM EDTA (ThermoFisher)). Затем планшеты промывали три-четыре раза центрифугированием (1200 об/мин, 5 мин) с последующей аспирацией буфера. После двух промывок буфером FACS клетки окрашивали на льду с помощью козьего антитела к IgG1 человека (H + L) Alexa Fluor 647 (Jackson Immuno) в течение 30 минут. После

инкубации клетки трижды промывали холодным буфером FACS, а затем ресуспендировали в буфере FACS, содержащем Sytox Green, для метки всех мертвых клеток (ThermoFisher). Затем планшеты анализировали на Intellicyt iQue Screener Plus (Sartorius) в течение трех часов после окрашивания.

5

Активация Т-клеток и анализ уничтожения с использованием визуализации живых клеток Incucyte

Для определения влияния исследуемых молекул на активацию Т-клеток и потенциал уничтожения опухолевых клеток использовали систему визуализации живых клеток Incucyte (Sartorius). В качестве клеток-мишеней для человеческих донорских пан-Т-клеток (Nemacare) служила клеточная линия H929-Fluc-GFP собственной разработки. Анализ проводили в 96-луночной планшете при соотношении Т-клеток и мишени 1 : 1, 3 : 1 и 5 : 1 в ходе нескольких экспериментов. Исследуемые молекулы (BGCB463 и B23B251) добавляли в начальной концентрации 40 нМ или 10 нМ и серийно разводили 1 : 4 в полной среде. Все молекулы тестировали как минимум в двух повторностях. Обнаружение статуса активации Т-клеток контролировали с помощью антитела к CD25-Alexa Fluor 647 (Biolegend). Клетки в планшетах нормализовали по температуре и затем помещали в систему визуализации живых клеток Incucyte (модель S3), находящуюся в инкубаторе с температурой 37 °C. Четыре изображения на лунку в фазе, зеленом и красном каналах регистрировали каждые 3 часа в течение приблизительно 5 дней. На основе изображений образцов в программе для анализа Incucyte (Sartorius, v.2019B Rev2) было создано определение анализа для получения количества объектов в зеленом (клетки-мишени) канале и количества или суммарной интегральной интенсивности красного (активированные Т-клетки) канала.

Используя необработанные подсчеты по зеленому каналу (клетки-мишени), полученные в результате анализа программным обеспечением Incucyte, рассчитывали процент цитолиза мишеней в каждой концентрации и временной точке по отношению к среднему значению всех необработанных лунок на соответствующем планшете по следующей формуле для необработанных данных, экспортированных в Excel (Microsoft, Office 365): $(100 - (\text{исследуемая концентрация GPRC5D} / \text{среднее значение необработанных лунок}) \times 100)$. Для автоматизации этой работы исходные данные были преобразованы и переданы с помощью разработанного компанией Data Sciences приложения Shiny Application для быстрого расчета и передачи данных в программу

Prism, где представлено их графическое представление. После переноса данных в программу Prism (Graphpad Software, v.8.0.0) проводили их графическую обработку, рассчитывали стандартную ошибку среднего значения и кривые цитолиза и активации Т-клеток по времени. Для определения активации Т-клеток использовали сырые подсчеты или суммарную интегральную интенсивность реплик красного канала (CD25-AF647), которые затем отображали в программе Prism для построения графиков доза-ответ и активации.

Часть 2. Результаты

Дозочувствительное связывание Т-клеток и клеточной линии

Сначала с помощью FACS было определено связывание GPRC5D- и BCMA-связывающих плеч триспецифической молекулы путем измерения диапазона эффективной концентрации (EC) по кривой «доза-ответ» с использованием 4-параметрической подгонки при температуре 37 °C в течение 1 ч. Для оценки использовали набор клеток H929 (WT, GPRC5D-KO, BCMA-KO и GPRC5D/BCMA KO), а также аналогичный набор клеток MM.1R. Клеточная EC₅₀ составляет около 13 нМ для H929 дикого типа (WT) (ФИГ. 2А–2Г, таблица 7) и 2,4 нМ для MM.1R WT (ФИГ. 3А–3Г, таблица 8). Наблюдается явное влияние avidности, поскольку EC₅₀ и V_{max} снижаются в линиях GPRC5D-KO и BCMA-KO, в которых тестируется моновалентное связывание связывающих плеч мишени (таблица 7). Далее определяли клеточную EC₅₀ для CD3-связывающего Fab-плеча, используя очищенные пан-Т-клетки от трех случайных доноров. Как показано на ФИГ. 4А–4В, EC₅₀ на клеточном уровне для плеча CD3B376 (BGCB463) составляла приблизительно 329 нМ (таблица 9). Далее проводили оценку дозозависимого связывания при 4 °C для устранения возможных биологических эффектов. Как показано на ФИГ. 5А–5В, связывание сильнее (50–100 нМ) при 4 °C по сравнению с 37 °C, что может свидетельствовать об интернализации. Кроме того, две партии экспрессии BGCB463 (BGCB463.003, полученные при транзитной трансфекции, и BGCB463.004, полученные при стабильной трансфекции) непосредственно сравнивали на предмет связывания с H929, MM.1R и пан-Т-клетками, и не отмечали различий (ФИГ. 6А–6В).

Таблица 7. Эффективные концентрации на основе набора клеток H929

EC ₅₀ (нМ)	H929	H929 GPRC5D КО	H929 BCMA КО	EC ₉₀ (нМ)	H929	H929 GPRC5D КО	H929 BCMA КО
Прогон 1	14,0	106,4	195,4	Прогон 1	240,1	722,6	1861,4
Прогон 2	8,3	63,9	128,8	Прогон 2	356,2	200,3	871,8
Прогон 3	28,7	220,8	65,2	Прогон 3	45776,5	1996,4	1237,5
Цикл 4	нет подгонки	нет подгонки	нет подгонки	Цикл 4	нет подгонки	нет подгонки	нет подгонки
Прогон 5	2,4	456,8	48,8	Прогон 5	9450,2	4130,3	281,2
Средн.	13,3	212,0	109,5	Средн.	13955,7	1762,4	1063,0

Таблица 8. Эффективные концентрации на основе набора клеток MM.1R

EC ₅₀ (нМ)	MM.1R	MM.1R GPRC5D КО	MM.1R BCMA КО	EC ₉₀ (нМ)	MM.1R	MM.1R GPRC5D КО	MM.1R BCMA КО
Прогон 1	3,2	нет подгонки	нет подгонки	Прогон 1	128,1	нет подгонки	нет подгонки
Прогон 2	1,2	нет подгонки	16,6	Прогон 2	13,9	нет подгонки	198,7
Прогон 3	3,4	141,6	35,3	Прогон 3	75,5	2070,4	969,9
Цикл 4	1,6	489,9	7,2	Цикл 4	8,6	8298,7	38,2
Средн.	2,4	315,8	19,7	Средн.	56,5	5184,5	402,2

5

Таблица 9. Эффективные концентрации на основе Т-клеток

EC ₅₀ (нМ)	Донор 1	Донор 2	Донор 3	EC ₉₀ (нМ)	Донор 1	Донор 2	Донор 3
Прогон 1	769,8	572,5	548,9	Прогон 1	10735,6	7046,4	6008,2
Прогон 2	нет подгонки	нет подгонки	нет подгонки	Прогон 2	нет подгонки	нет подгонки	нет подгонки
Прогон 3	293,1	261,9	359,9	Прогон 3	2864,8	2267,3	4148,3
Цикл 4	209,9	192,1	254,8	Цикл 4	1698,0	1418,4	2173,5
Прогон 5	102,6	132,4	250,7	Прогон 5	493	860	2600
Средн.	343,9	289,7	353,6	Средн.	3947,9	2898,0	3732,5
Всего средн.	329,1			Всего средн.	3526,1		

Связывание с течением времени

Далее определяли поверхностную стабильность BGCB463, оценивая кинетическое связывание с течением времени с помощью FACS на наборах клеток H929 и MM.1R. Как показано на ФИГ. 7А–7Г, кинетика связывания стабильна на клетках H929 в течение 24-часового периода. Кроме того, двухвалентное связывание триспецифической молекулы имеет более сильный сигнал по сравнению с моновалентным связывающим плечом, оцененным в одиночных нокаутах, что, как и выше, согласуется с вероятным эффектом авидности. Эти результаты повторяются в наборе MM.1R (ФИГ. 8А–8Г).

Перекрестная реактивность видов/ортологов

Перекрестную реактивность у яванских макаков также определяли для обоих целевых связывающих scFv-плечей с помощью FACS на основе связывания клеток при 37 °C в течение 1 ч. С этой целью использовали клетки K562, стабильно экспрессирующие GPRC5D или BCMA человека и яванского макака. Как показано на ФИГ. 9А–9Д, EC₅₀ для scFv-плеча GC5B680 на клеточном уровне составляет приблизительно 30 нМ для GPRC5D человека и примерно в 10 раз слабее при концентрации около 400 нМ для GPRC5D яванского макака. Напротив, клеточная EC₅₀ для scFv-плеча BCMB519 составляет около 145 нМ для BCMA человека, в то время как связывание с BCMA яванского макака не обнаруживалось вплоть до 2 мкМ.

Для дальнейшего определения перекрестной реактивности у яванского макака клетки K562, которые использовали для связывания, были также использованы для определения цитотоксичности с использованием пан-Т-клеток человека. Как показано на ФИГ. 10А и 10Б, более слабое связывание с GPRC5D яванского макака по сравнению с GPRC5D человека коррелирует с более слабой цитотоксичностью и соответствующей более низкой активацией Т-клеток K562, экспрессирующих GPRC5D яванского макака. Аналогичная картина наблюдается для BCMA человека и яванского макака, однако на BCMA яванского макака Т-клеточный ответ практически отсутствует.

Связывание в 90% сыворотке человека

Для лучшего понимания связывания *in vivo* связывание оценивали в течение 1 ч при 37 °C в присутствии 90% человеческой сыворотки. GPRC5D- и BCMA-связывающие плечи scFv тестировали с клетками H929 (ФИГ. 11), тогда как CD3-

связывающий Fab тестировали с человеческими пан-Т-клетками (ФИГ. 12). В обоих типах клеток связывание BGCB463 не зависит от наличия сыворотки.

Цитотоксичность с течением времени

5 Для оценки кинетики уничтожения клеток *in vitro* использовали платформу на основе изображений Incucyte для получения данных кинетического уничтожения. Отслеживание уничтожения клеток-мишеней и активации Т-клеток во времени дает более подробное и качественное считывание цитотоксической активности по сравнению со стандартными анализами конечных точек на основе FACS. Как показано на ФИГ. 13А и 13Б, BGCB463 достигало заметной максимальной гибели примерно 10 через 72 часа при всех концентрациях, кроме самой низкой (1 пМ) при соотношении Е : Т 3 : 1. Для расширения этих данных также тестировали соотношения Е : Т 5 : 1 и Е : Т 1 : 1 (ФИГ. 14А–14Е). При Е : Т 5 : 1 все протестированные концентрации достигали максимального показателя уничтожения при 48–72 ч, где время до 15 максимального уничтожения обратно коррелировало с концентрацией. При Е : Т 1 : 1 все концентрации также достигают максимального показателя уничтожения, но в более поздних временных точках с такой же зависимостью от концентрации.

Интерференция связывания sBCMA с использованием сывороток пациента

20 Оценка потенциальной интерференции с растворимым BCMA (sBCMA) необходима для поддержки моделирования и прогнозирования дозы MABEL. Сыворотки пациентов выбирали в качестве физиологического источника растворимого BCMA и анализировали путем разведения в нормальной сыворотке. Как показано на ФИГ. 15А–15Г, даже самый высокий уровень 613 нг/мл не влияет на связывание 25 BGCB463 с клетками H929. Это относится ко всем сывороткам пациента с различными уровнями sBCMA.

Часть 3. Обсуждение и выводы

30 Временной цикл связывания для данной панели предназначен для определения стабильности молекулы на поверхности клеток в течение определенного времени, с оговоркой, что этот метод не позволяет отличить интернализацию от поверхностного окрашивания. BGCB463 сохраняет стабильный или возрастающий сигнал при всех концентрациях, испытанных на клетках наборов H929 и MM.1R KO. Таким образом, BGCB463 стабильно представлено на поверхности гематологических клеток-мишеней.

Для BGCB463 также измеряли перекрестную реактивность к BCMA и GPRC5D яванского макака. Связывание GPRC5D было примерно в 10 раз слабее для яванского макака по сравнению с человеком, что соответствовало показателям цитотоксичности. С другой стороны, связывание BCMA не вызывало перекрестной реакции вплоть до 2 мкМ, что коррелировало с наблюдением отсутствия функциональной активности.

Для оценки кинетики уничтожения и получения более детального представления о том, как BGCB463 опосредует перенаправление Т-клеток, использовали показатели цитотоксичности с течением времени. Наблюдали показатель уничтожения, приближающийся к максимальному цитолизу, время которого зависело как от концентрации молекулы, так и от соотношения Е : Т.

Поскольку BCMA существует в растворимой форме и его уровень у пациентов повышен, было очень важно оценить связывание в присутствии сывороток пациентов с разным уровнем sBCMA. Данные показали, что sBCMA не мешает связывание BGCB463 с поверхностью BCMA на клетках H929.

Пример 5. Биофизическая оценка триспецифического антитела BGCB463

Для BGCB463 был проведен ряд биофизических оценок, включая оценку связывания, характеристику белков, оценку 2-недельной стабильности в высоких концентрациях, химической и физической стабильности. Перечень оценок и их результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10. Биофизические оценки и их результаты для BGCB463

Характеристика TMP mAb	Результаты	Комментарии
Аффинность связывания для плеча CD3 человека (SPR)	KD = 3,1E-8 М Антиген: рекомбинантный CD3δε гетеродимерный конструктор	Н/О
Аффинность связывания для плеча BCMA человека (SPR)	KD = 8,4E-10 М Антиген: BCMW37	Н/О
Связывание Fcγ-рецептора (SPR)	Измеримое связывание с FcγR1, FcγRIIIa V158, FcγRIIIa F158, FcγRIIIa или FcγRIIb человека отсутствует. Измеримое связывание с FcγR1, FcγRIII, FcγRIIIa или FcγRIIb яванского макака отсутствует.	Подтверждена конструкция Fc с подавленной активностью
Связывание FcRn (SPR)	pH 6,0: KD hFcRn = 954 нМ KD cyFcRn = 826 нМ Более быстрая диссоциация при pH 7,4 относительно pH 6,0	Н/О
Интерференция сыворотки (Octet)	Значимое изменение скорости ассоциации в 50% сыворотке человека отсутствует K _a буфера / k _a сыворотки = 1,6 - BCMA	Н/О

Характеристика TMP mAb	Результаты	Комментарии
	K_a буфера / k_a сыворотки = 1,0 - CD3	
Эпитоп связывания GPRC5D	Не определено	Н/О
Эпитоп связывания CD3	Линейный эпитоп, охватывающий остатки 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161) цепи CD3ε	Последовательность эпитопа, определенная для родительского антитела CD3B376 относительно CD3εγ с помощью HDX-MS
Эпитоп связывания BCMA	Линейный эпитоп, охватывающий остатки 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи BCMA BCMW37	Данные HDX-MS показывают, что остатки 17–18 и 21–26 защищены BGCB465.
Интактная масса Abs, высвобождение (Масс-спектр.)	156 431,5 Да	Н/О
Профиль гликоформы (масс-спектр.)	Типичный профиль IgG1 с основной гликоформой G0F/G0F	Н/О
Уровень гомодимера(-ов) (Масс-спектр.)	HD1 и HD2 не обнаружены	Н/О
Уровни других связанных с продуктом примесей (Масс-спектр.)	Незначительное отсечение на HC2 (BCMA scFv) между AA 486–495. Незначительные потери LC CD3 и комбинированного VH + CH1 (pQ1-S222) плеча CD3.	Н/О
N-связанный gly (не Fc) (Масс-спектр.)	Не прогнозируется или не наблюдается	Н/О
Сайты O-связанного gly (Масс-спектр.)	Не наблюдается	Н/О
Гликирование (% относительной интенсивности) (Масс-спектр.)	HC1 (CD3) - 9,5%, LC1 (CD3) - 6,4%, HC2 (GPRC5D x BCMA) - 7,5%	Значения гликирования представляют верхний предел из-за избыточной оценки, вызванной отсутствием нулевого исходного уровня
Свободный Cys (Масс-спектр.)	Не прогнозируется или не наблюдается	Н/О
N-концевое удлинение/усечение (Масс-спектр.)	Не наблюдается	Н/О
Конформационная стабильность (DSC)	T_{m1} = 63,2 °C T_{m2} = 68,0 °C T_{m3} = 72,2 °C	Измерено в гистидине, 10 mM pH 6,5
% чистоты (2-этапная очистка) (AUC)	96,39% мономер	Измерено в гистидине, 10 mM pH 6,4
Стабильность в сыворотке (SEC-FDS)	3,7% увеличение агрегации при t_0 в сыворотке человека, 1,2% увеличение агрегации через 2 дня в сыворотке человека при 37 °C.	Оценка методом эксклюзионной хроматографии с использованием GPRC5D x CD3, меченного Alexa488
Взаимодействия IgG (SPR)	Не наблюдалось взаимодействия IgG	Н/О
Неспецифическое связывание	Не наблюдалось неспецифического связывания	Н/О
Изоэлектрическая точка (cIEF)	pI = 9,51 % площади кислотного/главного/основного пика: 44,8/54,9/0,3	Н/О
Относительная гидрофобность (aHIC)	Низкая поверхностная гидрофобность (индекс гидрофобности <0,6) с широким пиком	Н/О
Вязкость	5,48 cП	Определено при 150 мг/мл в 10 mM гистидине pH 6,5
Концентрация и % восстановления в гистидиновом буфере pH 6,5	Образец концентрировали до 176,5 мг/мл при восстановлении 89,4%	Н/О
% мономера (начальный) (AUC)	96,6%	Определено в гистидине pH 6,5
% мономера 2 недели, 4 °C (AUC)	84,7%	Определено в гистидине pH 6,5
% мономера 2 недели, 40 °C	66,3%	Определено в гистидине pH 6,5

Характеристика TMP mAb	Результаты	Комментарии
(AUC)		
Интактная МС после форсированной деградации (Масс-спектр.)	Все тестируемые пробы соответствовали ожидаемому значению массы. Испытание высоким уровнем pH приводило к незначительному отсечению scFv ВСМА, а также к незначительной потере LC CD3. Химическое окисление приводило к 3 окислениям на плече HC2 (scFv) и до 2 окислений на HC CD3.	Нет
Размер после форсированной деградации (aSEC)	Образец после физиологического (2 нед. 37 °C) и окислительного испытания поддерживал уровень >98% мономера; Образцы после испытания pH 8,5, 5 и 3,5 показали уровни 89–91% мономера; Высококонцентрированный образец после 2 недель при 40 °C показал значительное увеличение HMW с только 63% мономера.	Увеличение агрегации при высокой концентрации было очевидным с течением времени. Требуется последующее исследование состава для уменьшения склонности к агрегации
Чистота форсированной деградации (R и NR GXII)	NR GXII: Все испытуемые образцы сохранили уровень мономера $\geq 99\%$, за исключением образцов, подвергшихся физиологическим испытаниям (2 нед., 37 °C) (97%), испытаниям высокой концентрацией 40 °C 2 недели (95,9%) и высоким pH (76,1%). R GXII: Все испытуемые образцы сохранили уровень мономера $\geq 99\%$, за исключением образцов, подвергшихся испытаниям при 40 °C 2 недели (97,9%) и высоким pH (89,7%).	Нет
Аффинность связывания после форсированной деградации (SPR)	Аффинность к CD3 поддерживается при всех протестированных условиях испытания. Аффинность к ВСМА находилась в границах погрешности KD и % активных молекул при всех протестированных условиях испытания.	Н/О
Базальный уровень окисления	6,8% в M94 (CG5B680 scFv LCDR3) 4,7% в M232 (CG5B680 scFv HCDR3) <1% для всех других остатков CDR	Нет
Met/Trp (изменение при испытании окислением)	68,1% в M94 (CG5B680 scFv LCDR3) 15,1% в M232 (CG5B680 scFv HCDR3) 67,9% в M600 (BCMB519 scFv LCDR3)	Нет
Базальный уровень дезамидирования	<1% в CDR	Нет
Сайты дезамидирования (изменение при испытании)	Нет значительных изменений	Нет
Уровень базальной изомеризации	<1% в CDR	Нет
Сайты изомеризации (изменение при испытании)	20% изомеризации D27 в HC-CDR1 CD3B2186	Примечание. Изомеризация D27 при испытании pH наблюдается у всех кандидатов CD3B376 и считается, что не влияет на активность.

Пример 6. Дизайн молекулы, последовательность и структура триспецифического антитела BGCB491

5 BGCB491 представляет собой триспецифическое антитело к иммуноглобулину (Ig) G1, способное одновременно или независимо связываться с эпсилон-субъединицей рецепторного комплекса кластера дифференцировки 3 (CD3ε) (Uniprot ID: P07766) на Т-лимфоцитах (Т-клетках) и GPRC5D (член D группы 5 семейства C сопряженных с G-

белком рецепторов, Uniprot ID: Q9NZD1) и BCMA (антиген созревания В-клеток, TNFRSF17, Uniprot ID: Q02223) на опухолевых клетках. Антитело имеет мутации L234A, L235A и D265S в константной области, отменяющие взаимодействие с Fc-рецепторами, а гетеродимеризация усилена с помощью мутаций платформы выступ-во-
 5 впадину¹. Цепь «впадины» антитела к CD3ε также включает «RF-мутации» (H435R, Y436F) для разрушения связывания белка А мономерных и гомодимеризованных цепей впадины². Молекула содержит область Fab антитела к CD3ε на цепи «впадина, RF» и v-область scFv антитела к GPRC5D, слитую с C-концом. Термин «выступ» означает scFv антитела к BCMA. Триспецифическое антитело было разработано для оценки
 10 терапевтического потенциала двойного нацеливания на опухоль GPRC5D и BCMA и CD3 для перенаправления Т-клеток. Пример BGCB491 представлен на ФИГ. 16.

Триспецифическое антитело BGCB491 было получено путем совместной экспрессии тяжелой цепи А (HC) антитела к CD3, слитой с C-концом scFv антитела к GPRC5D и легкой цепи (LC) антитела к CD3 с scFv антитела к BCMA, слитой с
 15 «выступом», содержащим тяжелую цепь В. Варибельная область антитела к CD3 (VR000017350) была обнаружена путем иммунизации трансгенных гуманизированных крыс [OmniRat (OMT™)] рекомбинантным белком CD3ε. Варибельная область антитела к GPRC5d (VR000038761), представленная в BGCB491, получена из mAb GC5B680, созданного путем иммунизации трансгенных гуманизированных мышей
 20 [Ablexis] ДНК, кодирующей GPRC5d. Родительская v-область (VR000029832) содержала мотив «NSS» в области HC-каркаса 3, который представлял риск N-связанного гликозилирования и являлся мутацией из зародышевой линии IGHV2-26*01. Для устранения риска N-связанного гликозилирования сайт подвергли обратной мутации в зародышевую последовательность «STS», что привело к образованию
 25 конечной варибельной области VR000038761. Варибельная область антитела к BCMA (VR000003260), представленная в BGCB491, получена из mAb BCMB519, созданного путем иммунизации трансгенных гуманизированных мышей [Ablexis] рекомбинантным белком BCMA. В эту v-область не вносили никаких дополнительных модификаций. V-области как антитела к GPRC5D, так и антитела к BCMA были
 30 оформлены в виде одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) в конечной молекуле.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи и легкой цепи BGCB491, полученная из последовательности κДНК (SEQ ID NO: 165, 166 и 167) BGCB491 и подтвержденная с помощью картирования пептидов и масс-спектрометрии, показана

ниже (таблица 11). В каждой цепи жирным шрифтом выделены и подчеркнуты 3 области, определяющие комплементарность (CDR), указанные в соответствии с нумерацией АВМ. Остаток Gln в положении 1 тяжелой цепи 1 BGCB491, остаток Gln в положении 1 легкой цепи BGCB491 и остаток Glu в положении 1 тяжелой цепи 2 BGCB491 составляют N-конец зрелых цепей. Обе тяжелые цепи, содержащие AAS IgG1 BGCB491, имеют следующие точечные мутации: L234A, L235A и D265S. Тяжелая цепь 1 из BGCB491 обладает мутациями «впадины»: T366S, L368A, Y407V и RF-мутациями: H435R, Y436F, в то время как тяжелая цепь 2 имеет мутацию «выступа»: T366W. Мутации «выступы-во-впадины» способствуют гетеродимеризации Fc³. «RF-мутации» нарушают связывание с белком А. Мутации для сайленсинга рецептора FcγR (AAS) и мутации «выступы-во-впадины» подчеркнуты в последовательностях ниже.

Таблица 11. Аминокислотная последовательность BGCB491

Площадь	Последовательность AA	SEQ ID NO:
Легкая цепь 1	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCT GTSSNIG TYKFVSWYQQ HPDKAPKVLL Y EVSKRPS GV SSRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDQADYHC VSYAGSGTLL FGGGTKLTVL GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	30
Тяжелая цепь 1	QVQLQQSGPR LVRPSQTLSTL TCAIS GDSVF NNNAAWSWIR QSPSRGLEWL GRTYRISKWL YDYAVSVKSR ITVNPDTSRN QFTLQLNSVT PEDTALYYCA R GYSSFDY W GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE AAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVSVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLVHQQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSL SC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRF QKSLSLSPGK GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS IS CRSSQSLV HSDGNTYLSW LQQRPGQPPR LLIY KISNRF FGVPDRFSGS GAGTDFTLKI SRVEADVGV YYC MQATQFP HTF GQGTKLE IKGGSEGKSS GSGSEKSTG GSQVTLKESG PVLVKPTETL TLTCTV SGFS LTNIRMSVSW IRQPPGKALE WLA HIFSNDK KSYSTSLKSR LTISRDTSKS QVVLTLTNVD PVDATATYYCA R MRLPYGMDV WGQGTTVTVS S	29
Тяжелая цепь 2	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC RASQIS SSFLT WYQQK PGQAPRLLIY GASSRAT GIP DRFSGGGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC Q HYGSSPMYTF GQGTKLEIKG GSEGKSSGSG SESKSTGGSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAAS GFTFSS YAMSWVRQAP GKGLEWVSA I SGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAK DEG YSSGHYYGMD VWQGTTVTV SSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VSVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SL W CLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCVSMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	31

Пример 7. Оценка риска иммуногенности триспецифического антитела BGCB491

Последовательности триспецифических антител были проанализированы на предмет потенциальной иммуногенности с использованием скорректированных показателей Т-регуляторных клеток (T_{reg}) из программы прогнозирования иммуногенности EpiVax EpiMatrix *in silico*⁴ (таблица 12). Программа EpiVax рассчитывает потенциал связывания с наиболее распространенными молекулами HLA в каждом из «супертипов». В отчете представлены результаты, репрезентативные для >90% человеческих популяций по всему миру, без необходимости тестирования каждого гаплотипа в отдельности. Оценка EpiVax рассчитывается путем суммирования оценок EpiMatrix всех предсказанных Т-клеточных эпитопов, содержащихся в данной последовательности белка, с поправкой на ожидаемое содержание Т-клеточных эпитопов и длину белка. Интерпретация оценки EpiVax представлена ниже: оценка EpiVax < -20 представляет собой «идеальный» вариант; оценка EpiVax от -20 до +20 представляет собой «приемлемый» вариант; и оценка EpiVax > +20 представляет собой «неприемлемый» вариант.

Таблица 12. Оценка иммуногенности для BGCB491

BGCB491 Информация о цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области	SEQ ID NO:	EpiVax оценка	Интерпре- тация оценки EpiVax
VL легкой цепи 1 (CD3B376)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKF VSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSGVSSRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVS YAGSG TLLFGGGTKLTVL	7	-44,88	Идеальный
VH тяжелой цепи 1 (CD3B376)	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTLCAISGDSVFNN NAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWLYD YAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDT ALYYCARGYSSFDYWGQGTLLVTVSS	8	+65,28	Неприемлемый
VL N-концевого scFv тяжелой цепи 2 (GC5B680 N68S, S69T)	DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSD GNTYLSWLQQRPGQPPRLIYKISNRFFGVDP RFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQA TQFPHTFGQGTKLEIK	15	-3,12	Приемлемый
VH N-концевого scFv тяжелой цепи 2 (GC5B680 N68S, S69T)	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIR MSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSL KSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYC ARMRLPYGMDVWGQGTTVTVSS	16	-11,65	Приемлемый
VL C-концевого scFv тяжелой цепи 2 (BCMB519)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSFLT WYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGGG SGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTF GQGTKLEIK	23	-52,88	Идеальный
VH C-концевого scFv тяжелой цепи 2 (BCMB519)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQGTTVTVSS	24	-54,35	Идеальный

Пример 8. Исследования по сравнению триспецифических антител

BGCB463 и BGCB491, как описано выше, были протестированы в серии следующих исследований.

5 *Триспецифические антитела опосредуют уничтожение только положительных клеток-мишеней*

10 BGCB463, BGCB491 и три контроля (BGCB4821 (CD3xNullxNull), BGCB483 (CD3xNullxBAMA), BGCB484 (CD3xGPRC5DxNull)) тестировали против BAMA⁺ GPRC5D⁺ клеток (ФИГ. 17А) и BAMA⁻ GPRC5D⁻ клеток (ФИГ. 17Б). Соотношение
 15 эффектора к мишени (Е : Т) составляло 3 : 1; n = 1 доноров Т-клеток, инкубация 72 часа, максимальная концентрация 53 нМ, разведение 1–5. Испытания проводили для оценки как цитотоксичности, так и активации Т-клеток. Результаты показывают, что BGCB463 и BGCB491 опосредуют уничтожение только BAMA⁺ GPRC5D⁺ клеток (как показано на ФИГ. 17А), в то время как BAMA⁻ GPRC5D⁻ клетки не подвергаются
 20 воздействию (как показано на ФИГ. 17Б).

Триспецифические антитела проявляют активность в истощении клональных клеточных линий (CRISPR)

20 BGCB463 и BGCB491 истощали клеточные линии H929 WT, GPRC5D KO и BAMA KO через 72 и через 96 часов после первичной инкубации (ФИГ. 18А). Соотношение Е : Т составляло 3 : 1, n = 5 доноров Т-клеток; инкубация 72 (5) и 96 (4) часов; максимальная концентрация 532 нМ, градиент разведения 1–5. Значения EC₅₀ приведены ниже в таблице 13.

Таблица 13. Значения EC₅₀ при испытании цитотоксичности в течение 72/96 часов с использованием BGCB463 и BGCB491

25

Время инкубации	BGCB463	BGCB491	Тип клеток
72 ч	Цитотоксичность		
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,007	0,006	H929 дикого типа
	2,055	0,322	H929-GPRC5D KO
	0,539	4,517	H929-BAMA KO
96 ч			
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,003	0,003	H929 дикого типа
	1,580	0,226	H929-GPRC5D KO
	0,269	2,759	H929-BAMA KO

BGCB463 и BGCB491 также вызывают активацию Т-клеток, истощая при этом клетки CRISPR. Оба антитела демонстрируют повышенную активацию Т-клеток через 72 часа и 96 часов в тех же клетках H929 WT, GPRC5D KO и BCMA KO, как описано выше (ФИГ. 18Б и таблица 14).

5 **Таблица 14. Значения EC₅₀ для испытания Т-клеток в течение 72/96 часов с использованием BGCB463 и BGCB491**

Время инкубации	BGCB463	BGCB491	Тип клеток
72 ч	Активация Т-клеток		
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,009	0,011	H929 дикого типа
	3,139	0,520	H929-GPRC5D KO
	0,517	3,110	H929-BCMA KO
96 ч			
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,007	0,009	H929 дикого типа
	3,507	0,480	H929-GPRC5D KO
	0,445	3,458	H929-BCMA KO

Триспецифические антитела могут истощать клеточные линии лимфомы (только BCMA)

10 BGCB463 и BGCB491 были протестированы в анализах цитотоксичности и активации Т-клеток на линиях клеток H929, RAMOS и GRANTA-519. Результаты показывают, что оба антитела истощают линии RAMOS и GRANTA-519, хотя требуются более высокие концентрации обоих антител (ФИГ. 19, значения EC₅₀ представлены в таблице 15). Соотношение Е : Т составляло 5 : 1, n = 1 доноров Т-клеток; инкубация только 72 часа; максимальная концентрация 53 нМ; и разведение 1–

15 5.

Таблица 15. Значения EC₅₀ для истощения клеточной линии лимфомы с использованием BGCB463 и BGCB491

	BGCB463	BGCB491	Клеточная линия
	Цитотоксичность		
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,004	0,005	H929 дикого типа
	N/O	2,813	Ramos
	80,980	8,584	Granta-519
	Активация Т-клеток		
Значение EC ₅₀ (нМ)	0,012	0,022	H929 дикого типа
	17,580	1,387	Ramos
	3,300	1,644	Granta-519

Триспецифические антитела истощают целевые положительные клетки при анализе цельной крови

5 BGCB463 и BGCB491 были протестированы в анализах цитотоксичности и активации Т-клеток цельной крови с клетками H292. Результаты показывают цитотоксичность и активацию Т-клеток (ФИГ. 20, значения EC₅₀ представлены в таблице 16). Соотношение Е : Т составляло 5 : 1, n = 2 доноров цельной крови; инкубация 48 часов; максимальная концентрация 532 нМ; и разведение 1–5.

Таблица 16. Значения ЕС для истощения клеток цельной крови с использованием BGCB463 и BGCB491

10

Значение ЕС (нМ)	BGCB463	BGCB491
	Цитотоксичность	
EC ₂₀	0,159	0,084
EC ₅₀	0,574	0,648
EC ₉₀	4,412	16,380
	Активация Т-клеток	
EC ₂₀	0,044	0,027
EC ₅₀	0,297	0,544
EC ₉₀	6,199	63,160

Триспецифические антитела способствуют регрессу роста опухоли у мышей

15 Было показано, что BGCB463 подавляет рост опухоли в моделях с ксенотрансплантатами у мышей MM.1S и RPMI 8226 при введении достаточно высокой дозы: 2 мкг или 10 мкг в модели MM.1S (ФИГ. 21А) или 5 мкг или 10 мкг в модели RPMI 8226 (ФИГ. 21Б). Опухоли прекращали рост либо показывали снижение роста по сравнению с контрольными условиями.

20 Кроме того, было показано, что BGCB463 и BGCB491 подавляют рост опухоли в профилактических моделях с ксенотрансплантатами у мышей H929. По сравнению с PBS-контролем обе дозы 0,5 мкг и 5 мкг замедляли рост опухоли как в модели H929-BCMA KO, так и в модели H929-GPRC5D KO, причем более высокая концентрация 5 мкг давала больший эффект (ФИГ. 22).

Анализ кривой доза-ответ пан-Т-связывания

BGCB463 и BGCB491 исследовали в течение 1 ч, при 37 °С путем анализа кривой доза-ответ связывания с пан-Т-клетками. Использовали человеческие пан-Т-клетки от двух доноров, начальные концентрации тестируемых молекул составляли 2 мкМ при разведении 1 : 3 и 11-точечной кривой доза-ответ. Вторичное обнаружение с помощью Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L). FACS проводили с использованием Intellicyte Ique Screener plus. Результаты представлены на ФИГ. 23: для BGCB491 EC₅₀ 0,1903 и верхнее значение 188194, а для BGCB463 EC₅₀ 0,1258 и верхнее значение 303269. Продемонстрированные значения EC₅₀ находятся в пределах ожидаемых параметров для CD3-связывающего плеча.

Кривая доза-ответ связывания набора H929

BGCB463 и BGCB491 были протестированы против клеток H929 WT, H929 BCMA-KO, H929 GPRC5D-KO и H929 BCMA/GPRC5D с двойным нокаутом в анализе кривой доза-ответ связывания набора в течение 1 часа при 37 °С. Результаты представлены на ФИГ. 24А–24Г, все с нулевым контролем (BGCB510). Значения EC приведены в таблице 17. Результаты показали, что BGCB491 имеет повышенное BCMA-опосредованное связывание и пониженное GPRC5D-опосредованное связывание по сравнению с BGCB463.

Таблица 17. Значения EC (мкМ) для BGCB463 и BGCB491 в связывании с набором H929

	BGCB463	BGCB491
	<i>H929 дикого типа</i>	
EC ₅₀	Н/О	0,270
EC ₉₀	Н/О	25,049
	<i>H929 BCMA-KO</i>	
EC ₅₀	11,7	3,183
EC ₉₀	Н/О	Н/О
	<i>H929 GPRC5D-KO</i>	
EC ₅₀	0,504	0,210
EC ₉₀	8,385	3,896

Анализ триспецифических антител

В следующей таблице 18 представлены различные типы анализов BGCB463 и BGCB491.

Таблица 18. Сводные данные по анализу триспецифических антител BGCB463 и BGCB491

Анализ		BGCB463	BGCB491
Чистота (AUC) (после 3-этапной очистки)		96,4% мономера	98,9% мономера
Конформационная стабильность (DSC, гистидин, pH 6,5)		Tms = 63 °C, 68 °C, 72 °C	Tms = 63 °C, 68 °C, 72 °C
Измеренное значение pI (cIEF)		pI: 9,51	pI: 9,56
Относительная гидрофобность (aHIC)		Умеренная гидрофобность	Относительная низкая гидрофобность (HI = 0,38)
Анализ PTM (ЖХ-МС)		<10% CDR PTM	<5% CDR PTM
Аффинность связывания (SPR)		KD: CD3 (31,3 ± 8,7 нМ) BCMA (844 ± 128 пМ)	KD: BCMA (2,12E-10 М); CD3 (2,51E-08 М)
Интерференция сыворотки (Octet)		Влияние на связывание отсутствует	Влияние на связывание отсутствует
Стабильность сыворотки (SEC-FDS, стабильная партия)		Увеличение концентрации HMW на ~12% после 7-дневной инкубации при 37 °C	Увеличение концентрации HMW на ~5% после 7-дневной инкубации при 37 °C
Неспецифическое связывание (SPR)		Нет	Нет
Концентрация		~180 мг/мл, восстановление 89%, 97% мономера	~180 мг/мл, восстановление 91%, 97,5% мономера
Вязкость при 150 мг/мл		5,48 сП	6,3 сП
HCLF: %мономера после 2 недель при 4 °C и 40 °C (AUC)		Агрегация при 180 мг/мл увеличивалась до 15% и 34% после 2 недель при 4 °C и 40 °C	Агрегация при 180 мг/мл увеличивалась до 36% и 34% после 2 недель при 40 °C, увеличение HMW при 4 °C отсутствует
Физиологические испытания: 37 °C, 2 мг/мл, PBS pH 7,4		Изменения физических/химических свойств / аффинности отсутствуют	Увеличение HMW отсутствует, значительное увеличение LMW (15% по SEC, ~18% по GXII): На 18% более низкая связывающая активность к CD3, связывание с BCMA без изменений
Испытания с индуцированием PTM	pH 8,5, 1 неделя, 40 °C	20% изомеризации D27 (CD3, HCDR1), связывание без изменений <10% дезамидирование/изомеризация в других остатках CDR	~12% изомеризация D27 (CD3, HCDR1); увеличение LMW (~15% по SEC, ~20% по GXII): связывание без изменений
	pH 5, 1 неделя, 40 °C	Без увеличения PTM CDR	Нет значительных изменений
	pH 3,5, 6 ч, к. т.	Без увеличения PTM CDR	Нет значительных изменений
	Химическое окисление	68% окисления M94 15% окисления M232 68% M600; Связывание CD3 без изменений, связывание BCMA с 2-кратным высвобождением	97% окисления M94 (GC5B680, LCDR3); 99% M600 (LCDR3 BCMB519); Связывание CD3 без изменений, небольшие изменения в аффинности связывания BCMA (~2–3-кратное высвобождение)
	Окисление металла	Без увеличения PTM CDR	Нет значительных изменений

Пример 9. Биофизические оценки триспецифического антитела BGCB491

5 В таблице 19А приведены данные о связывании с рекомбинантными антигенами, видовой кросс-реактивности, идентификации эпитопов, связывании с Fc-рецепторами и биофизических характеристиках BGCB491. В таблице 19В представлены дополнительные характеристики BGCB491.

Таблица 19А. Перечень биофизических оценок и результатов для BGCB491

Характеристика TMP mAb	Результат	Комментарии
Связывание		
Аффинность связывания для плеча CD3 человека (SPR)	$K_D = 2,5 \times 10^{-8}$ М	Антиген: рекомбинантный CD3εγ гетеродимерный конструктор (CD3W200)
Аффинность связывания для плеч ВСМА и GPRC5D человека (SPR)	ВСМА человека: $K_D = 2,1 \times 10^{-10}$ М; Антиген: BCMW37. Человеческий GPRC5D: нет данных SPR для GPRC5D из-за отсутствия репрезентативного растворимого реагента для этой трансмембранной мишени. Вместо этого оценивали аффинность связывания с использованием клеточного метода на клетках H929-BCMA-КО (см. пример 11)	Связывание родительского ВСМА с использованием антигена BCMW37: $K_D = 2,8 \times 10^{-10}$ М в виде scFv; $EC_{50} = 2,3-3,2$ нМ в виде связывания scFv с клетками H929 и MM.1R; Исходное связывание GPRC5D с клетками H929 и MM.1R: $EC_{50} = 6-24$ нМ в виде Fab
Перекрестная реактивность для scFv BCMB519 к ВСМА яванского макака (SPR)	Отсутствие связывания / низкое связывание до 300 нМ	Данные связывания собирали из BCMB601, содержащего scFv BCMB519
Связывание Fcγ-рецептора (SPR)	Значимое связывание отсутствует	Как и ожидалось для каркаса hIgG1-AAS с подавленной активностью
Связывание FcRn (SPR)	pH 6,0 : hFcRn $K_D = 485$ нМ; cyFcRn $K_D = 314$ нМ	Быстрая диссоциация при pH 7,4
Интерференция сыворотки (Octet)	k_a буфера / k_a сыворотки < 2,0	Значимое изменение скорости ассоциации с bt-BCMA и bt-CD3 в 50% сыворотке человека отсутствует. Не определено для GPRC5D из-за отсутствия репрезентативного растворимого реагента.
GPRC5D-связывающий эпитоп	Не определено	Н/О
CD3-связывающий эпитоп	Линейный эпитоп, охватывающий остатки 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161)) цепи CD3ε (P07766, CD3E_Human)	Последовательность эпитопа, определенная для родительского антитела CD3B376 относительно CD3W220 с помощью HDX-MS
BCMA-связывающий эпитоп	Линейный эпитоп, охватывающий остатки 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи BCMA BCMW37	Данные HDX-MS показывают, что остатки 17–18 и 21–26 BCMW37 защищены BGCB465 (содержит такой же scFv антитела к BCMA)
Определение характеристик белка		
Интактная масса Abs, высвобождение (МС)	155 978,8 Да	Н/О
Профиль гликоформы (МС)	Типичный профиль IgG1 с основной гликоформой G0F/G0F	Н/О
Уровень гомодимера (-ов) (МС)	HD1 и HD2 не обнаружены	Н/О
Уровни других связанных с продуктом примесей (МС)	Не наблюдается	Н/О

Характеристика TMP mAb	Результат	Комментарии
N-связанный gly (не Fc) (MC)	Не прогнозируется или не наблюдается	Н/О
Сайты О-связанного gly (MC)	Не наблюдается	Н/О
Гликирование (% относительной интенсивности) (MC)	HC1 (CD3), 16,7%; LC1 (CD3), 5,4%; HC2 (GPRC5DxBCMA), 8,1%	Значения гликирования представляют верхний предел из-за избыточной оценки, вызванной отсутствием нулевого исходного уровня
Свободный Cys (MC)	Не прогнозируется или не наблюдается	Н/О
N-концевое удлинение/усечение (MC)	Не наблюдается	Н/О
Конформационная стабильность (DSC)	$T_{m1} = 62,9\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{m2} = 68,3\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{m3} = 71,9\text{ }^{\circ}\text{C}$	Измерено в гистидине, 10 mM pH 6,5; T_{m1} обеспечивал домен Fab CD376; T_{m2} обеспечивали несколько частей этой молекулы; T_{m3} обеспечивал домен CH3
% чистоты (2-этапная очистка) (AUC)	98,9% мономера	Измерено в L-гистидине, 10 mM pH 6,5
Стабильность сыворотки (SEC-FDS)	Увеличение концентрации HMW на ~5% после 7-дневной инкубации при 37 °C	Оценка с помощью SEC с использованием меченного Alexa488 триспецифического антитела к BCMAxGPRC5DxCD3
Неспецифическое связывание	Не наблюдалось неспецифического связывания	Н/О
Изоэлектрическая точка (cIEF)	pI = 9,56; % площади кислотного/главного/основного пика: 46/54/0	Н/О
Относительная гидрофобность (aHIC)	Низкая гидрофобность (индекс гидрофобности 0,38), но широкий и хвостатый пик	Н/О
Вязкость	6,3 cП	Измерено при 150 мг/мл в 10 mM L-гистидине pH 6,5
2-недельная стабильность высокой концентрации (4 и 40 °C, мишень 150 мг/мл)		
Концентрация и % восстановления в L-гистидиновом буфере pH 6,5	Образец концентрировали до 183,5 мг/мл при восстановлении 91%	Н/О
% мономера (начальный) (AUC)	97,5%	Определено в L-гистидине, 10 mM pH 6,5
% мономера, 2 недели, 4 °C (AUC)	95,4%	Определено в L-гистидине, 10 mM pH 6,5
% мономера, 2 недели, 40 °C (AUC)	62,8%	Определено в L-гистидине, 10 mM pH 6,5

Характеристика TMP mAb	Результат	Комментарии
Химическая (РТМ) и физическая стабильность		
Интактная МС после форсированной деградации (МС)	В результате химической окислительной обработки на каждой НС было проведено по 4 окисления. При физиологическом испытании фрагменты наблюдались из всех доменов. В результате деамидирования в основном образуются фрагменты GPRC5D, хотя наблюдались также 2 фрагмента scFv BCMA.	Н/О
Размер после форсированной деградации (aSEC)	% интактного мономера: Высвобождение = 100,0; *Физиолог. = 96,0; Термич. = 63,7; pH 8,5 = 83,2; «+5,0» = pH 99,3; pH 3,5 = 100,0; Хим. окисл. = 98,5; Метал. окисл. = 97,6	Увеличение агрегации при высокой концентрации при 40 °С было очевидным с течением времени. Требуется последующее исследование состава для уменьшения склонности к агрегации. Наблюдалось отсечение после достижения pH 8,5 и физиологического испытания.
Чистота форсированной деградации (R и NR GXII)	% интактн. NR GXII Высвобождение = 100; Физиологич. = 82; Термич. = 99; pH 8,5 = 82; «+5,0» = pH 99; «3,5» = pH 100; Хим. окисл. = 100; Метал. окисл. = 100	Наблюдалось отсечение после достижения pH 8,5 и физиологического испытания.
Связывание CD3 после форсированной деградации (SPR)	Аффинность (M) / % активности: Высвобождение = $2,51 \times 10^{-8}$ / 100; Физиологич. = $1,93 \times 10^{-8}$ / 82; Термич. = $2,58 \times 10^{-8}$ / 100; pH 8,5 = $2,16 \times 10^{-8}$ / 93; pH 5,0 = $2,26 \times 10^{-8}$ / 88; pH 3,5 = $2,17 \times 10^{-8}$ / 94; Хим. окисл. = $2,27 \times 10^{-8}$ / 93; Метал. окисл. = $2,33 \times 10^{-8}$ / 98	Аффинность к CD3 удерживалась при всех протестированных условиях испытания. Снижение % активных видов после испытания при pH 8,5.
Связывание BCMA после форсированной деградации (SPR)	Аффинность (M) / % активности: Высвобождение = $2,12 \times 10^{-10}$ / 100; Физиологич. = $1,43 \times 10^{-10}$ / 110; Термич. = $2,81 \times 10^{-10}$ / 137; pH 8,5 = $1,60 \times 10^{-10}$ / 114; pH 5,0 = $2,07 \times 10^{-10}$ / 154; pH 3,5 = $1,75 \times 10^{-10}$ / 116; Хим. окисл. = $5,37 \times 10^{-11}$ / 131; Метал. окисл. = $2,15 \times 10^{-10}$ / 110	Н/О

Характеристика TMP mAb	Результат	Комментарии
Базальный уровень окисления	2,4% в M94 (GC5B680 scFv LCDR3); 1,3% в M166 (GC5B680 scFv HCDR1); 1,9% в M232 (GC5B680 scFv HCDR3); 4,4% в M600 (LCDR3 BCMB519)	H/O
Met/Trp (изменение при испытании окислением)	96,9% в M94 (GC5B680 scFv LCDR3); 14,0% в M166 (GC5B680 scFv HCDR1); 14,3% в M232 (GC5B680 scFv HCDR3); 99,2% в M600 (BCMB519 scFv LCDR3)	H/O
Базальный уровень дезамидирования	<1% в CDR	H/O
Сайты дезамидирования (изменение при испытании)	Нет значительных изменений	H/O
Уровень базальной изомеризации	<1% в CDR	H/O
Сайты изомеризации (изменение при испытании)	11,7% изомеризации D27 в CD3B376 HCDR1; 5,3% изомеризации D731 в BCMB519 scFv LCDR3	Примечание. Изомеризация D27 при испытании pH наблюдалась у всех кандидатов CD3B376 и считается, что не влияет на активность.

AAS, L234A, L235A и D265S; Ab, антитело; aHIC, аналитическая хроматография гидрофобного взаимодействия; aSEC, аналитическая эксклюзионная хроматография; AUC, аналитическое ультрацентрифугирование bt, биотинилированный; CDR, определяющая комплементарность область; Хим. окисл., химическая окисление; cIEF, капиллярное изоэлектрическое фокусирование; Суно (су), яванский макак; Cys, цистеин; DSC, дифференциальная сканирующая калориметрия; EC₅₀, 50% эффективная концентрация; Fab, антигенсвязывающий фрагмент; Fc, кристаллизующийся фрагмент; FcRn, неонатальный Fc-рецептор; FDS, система определения флуоресценции; Gly, гликозилирование; h, человеческий; HC, тяжелая цепь; HCDR, определяющая комплементарность область тяжелой цепи; HD, гомодимер HDX, водородно-дейтериевый обмен; HMW, более высокая молекулярная масса; Ig, иммуноглобулин; k_a, константа ассоциации; K_D, равновесная константа диссоциации; LC, легкая цепь; LCDR, определяющая комплементарность область легкой цепи, mAb, моноклональное антитело; Met, метионин; Метал. Окисл., окисление металлом; MC, масс-спектрометрия H/O, не оценивали; NME, новое молекулярное соединение NR GXII, невосстанавливающий капиллярный электрофорез; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; pI, изоэлектрическая точка; PS20, полисорбат 20; ссылки; R GXII, восстанавливающий капиллярный электрофорез; scFv, одноцепочечный вариабельный фрагмент; SEC, эксклюзионная хроматография; SPR, поверхностный плазмонный резонанс; T_m, температура плавления; TMP, целевой лекарственный препарат, Trp, триптофан.

Таблица 19В. Дополнительные характеристики плеч связывания в BGCB491

Ведущие параметры		Характеристики
BCMA BCMB519	Аффинность	K _D = 0,28 нМ в виде scFv (SPR) EC ₅₀ = 2,3–3,2 нМ в виде scFv (H929 и MM.1R)
	Эпитоп	Линейный эпитоп а.а. 17–26 (LLHACIPCQL)
	Функция	Блокирование связывания BAFF и APRIL [#] Отсутствие агонистической активности [#]
GPRC5D: GC5B680	Аффинность	EC ₅₀ = 6–24 нМ в виде Fab (H929 и MM.1R)
CD3: CD3B376	Аффинность	EC ₅₀ = 3,4 мкМ* (Т-клетка)
	Эпитоп	N-терминальный эпитоп а.а. 22–35 (QDGNEEMGGITQTP) цепи CD3ε
Нецелевой профиль	Retrogenix	CLEAN, отсутствие попаданий вне цели (связующие BCMA и GPRC5D)

*Т-клетка: EC_{50} определяли на основе экстраполяции фиксированной точки из-за ненасыщенных кривых связывания при самой высокой протестированной концентрации 2 мкМ

Пример 10. Определение связывания плеча-мишени и CD3-плеча BGCB491

5 Связывание BGCB491 с эндогенными опухолевыми клеточными линиями

Для оценки связывания BCMA- и GPRC5D-плеча BGCB491 *in vitro* использовали проточную цитометрию. BGCB491 и изотипический контроль тестировали на панели клеток H929-WT, H929-BCMA-KO, H929-GPRC5D-KO и H929-BCMA/GPRC5D-KO после инкубации в течение 1 часа при 37 °C.

10 BGCB491 продемонстрировало специфическое связывание с клетками дикого типа, а также с каждой нокаутной линией (КО), подтверждая связывание каждого отдельного целевого плеча связывания (ФИГ. 25, таблица 20).

Таблица 20. Значения EC_x для связывания BGCB491 с набором H929 WT и КО в 5 независимых экспериментах

	Прогон 1	Прогон 2	Прогон 3	Цикл 4	Прогон 5	Мед.
H929-WT						
EC_{20} (нМ)	15	NFC	H/O	4	8	8
EC_{50} (нМ)	270	NFC	H/O	34	66	66
EC_{90} (нМ)	25 000	NFC	H/O	878	1 912	1 912
H929-BCMA-KO (GPRC5D-плечо)						
EC_{20} (нМ)	NFC	19	NFC	NFC	NFC	NFC
EC_{50} (нМ)	NFC	66	NFC	NFC	NFC	NFC
EC_{90} (нМ)	NFC	489	NFC	NFC	NFC	NFC
H929-GPRC5D-KO (BCMA-плечо)						
EC_{20} (нМ)	33	17	23	10	12	17
EC_{50} (нМ)	210	54	224	50	53	54
EC_{90} (нМ)	3 900	345	7 900	645	535	645

15 EC_x х% эффективной концентрации; КО, нокаут; Мед., медиана; H/O, не оценивали; NFC, не полная кривая; WT, дикий тип.

Для оценки кинетики связывания триспецифического антитела BGCB491 на клеточных линиях H929 WT и MM.1R WT при 50, 10, 2 нМ в течение 24-часовой инкубации при 37 °C проводили 24-часовой эксперимент по кинетическому связыванию (см. ФИГ. 40). Как показано на ФИГ. 40, стабильные профили связывания наблюдались на обеих клеточных линиях в течение 24 часов.

Первичное Т-клеточное связывание BGCB491

25 Проточную цитометрию использовали для оценки связывания CD3-плеча (т. е. CD3B376) BGCB491 с CD3+ пан-Т-клетками, полученными от 7 различных здоровых людей. Определить EC_{50} для CD3B376 на клеточном уровне не удалось из-за

отсутствия кинетики насыщения в течение 1 часа (ФИГ. 26). Биоинформационная экстраполяция была проведена (ФИГ. 27) с использованием молекулы контрольного антитела CD3B376xNull (т. е. GCDB381), которая насыщается в пределах 2 мкМ верхней концентрации дозы-ответа для ограничения вершины кривой нелинейной регрессии с получением полной кривой, позволяющей оценить значения EC_x (таблица 21).

Таблица 21. Оценка значений EC_x связывания BGCB491 с Т-клетками на основе фиксированной точки насыщения из биоинформатической экстраполяции

Донор	Оценочная EC_{20} (мкМ)	95%-й доверительный интервал	Оценочная EC_{50} (мкМ)	95%-й доверительный интервал
D203727	0,222	(0,193, 0,255)	3,37	(3,01, 3,77)
D316144	0,279	(0,237, 0,329)	4,99	(4,26, 5,85)
D327645	0,188	(0,153, 0,230)	3,36	(2,86, 3,94)
Медиана	0,222		3,37	

EC_x х% эффективной концентрации; D, донор.

Несмотря на использование слабого CD3-связывающего плеча, BGCB491 продемонстрировало устойчивую субпикомолярную эффективность с максимальной цитотоксичностью в соотношениях Е : Т 1 : 1 и 1 : 3 в кинетическом анализе цитотоксичности, проведенном на Incucyte для трех доноров Т-клеток в течение 120 часов. В анализе цитотоксичности с течением времени использовали Incucyte S3 для оценки целевых кинетических профилей цитотоксичности и активации Т-клеток BGCB491 в клетках H929-GFP для трех доноров Т-клеток на протяжении 120 часов. Для BGCB491 был достигнут заметный максимум цитотоксичности примерно через 72 часа при всех концентрациях, кроме самой низкой (10 пМ) при соотношении Е : Т 1 : 3 (ФИГ. 42). Из кинетических графиков была получена информация о проценте цитолиза и активации Т-клеток на 72-, 93- и 120-часовых временных точках для соотношения Е : Т 1 : 1 (ФИГ. 43) и Е : Т 1 : 3 (ФИГ. 44). BGCB491 показало устойчивую субпикомолярную эффективность уничтожения в обоих соотношениях Е : Т (таблица 22). Более глубокая оценка свойств цитотоксичности представлена в примере 12.

Таблица 22. Средние значения ЕСх, полученные на основе процентного цитолиза Н929-GFP в кинетическом анализе уничтожения

	Е : Т 1 : 1	Е : Т 1 : 3
	72 часа	
ЕС ₂₀ (пМ)	2,1	1,1
ЕС ₅₀ (пМ)	12,7	6,3
ЕС ₉₀ (пМ)	212,6	93
	93 часа	
ЕС ₂₀ (пМ)	0,7	1,6
ЕС ₅₀ (пМ)	0,9	5,5
ЕС ₉₀ (пМ)	1,4	39
	120 часов	
ЕС ₂₀ (пМ)	0,4	2,3
ЕС ₅₀ (пМ)	0,7	5,2
ЕС ₉₀ (пМ)	1,8	18,9

ЕС_х х% эффективной концентрации; Е : Т, соотношение эффектор/мишень; GFP, зеленый флуоресцентный белок.

5 Таким образом, BGCB491 представляет собой полностью человеческое триспецифическое моноклональное антитело, нацеленное на CD3 TCR одним связывающим плечом и на BCMA или GPRC5D поверхностных клеточных антигенов опухоли оставшимися двумя связывающими плечами. BGCB491 продемонстрировало приемлемые собственные биофизические свойства и связание со всеми протестированными линиями клеток, экспрессирующими BCMA, GPRC5D и BCMA-GPRC5D.

Пример 11. Терапевтическая фармакология

15 Часть 1. Исследования in vitro

Поверхностная экспрессия и плотность белков рецепторов BCMA и GPRC5D в исследуемых клеточных линиях

20 Подмножество из 4 двухцелевых (т. е. BCMA-GPRC5D) положительных клеточных линий (т. е. MM.1S, H929, JIM-3 и OPM-2) и 2 двухцелевых отрицательных клеточных линий (т. е. MV-4-11 и OCI-AML-3) было оценено на предмет экспрессии белка методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) с использованием меченных фикоэритрином (PE) коммерческих антител к BCMA и антител к GPRC5D собственного производства. Во всех целевых позитивных клеточных линиях наблюдалось значительное изменение характера экспрессии по сравнению с изотипичным контролем, в то время как в целевых негативных клеточных линиях экспрессия не наблюдалась (таблица 23). Эти 6 клеточных линий с различными

уровнями экспрессии целевого белка на своей поверхности были выбраны для дальнейших функциональных анализов *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 23. Сводная информация о плотности рецепторов BCMA и GPRC5D в клеточных линиях

Клеточная линия	GPRC5D (Анализ-1)	GPRC5D (Анализ-2)	GPRC5D (Среднее)	BCMA (Анализ-1)	BCMA (Анализ-2)	BCMA (Среднее)
MM.1S	2091	4899	3495	1870	2237	2053
H929	2443	1995	2219	6955	6908	6932
OPM-2	12 109	8159	10 134	5703	4411	5057
JIM-3	1438	1528	1483	922	1533	1228
MV-4-11	37	92	64	72	52	62
OCI-AML-3	19	67	43	89	85	87

5 Плотность целевых рецепторов количественно определяли на целевых положительных и отрицательных клетках с использованием набора QuantiBRITE. Индивидуальные значения и среднее значение 2 отдельных экспериментов перечислены выше.

10 *Связывание BGCB491 с эндогенными линиями клеток, экспрессирующих BCMA-GPRC5D*

Затем определяли профили связывания BGCB491 (триспецифические mAb BCMAxGPRC5DxCD3) способами проточной цитометрии. Контрольные антитела BGCB491 и BCMAxGPRC5DxNull связывались с клетками MM, экспрессирующими BCMA и GPRC5D, дозозависимым образом (значения EC₅₀: MM.1S 33,39 нМ H929 185,50 нМ JIM-3 78,45 нМ OPM-2 10,07 нМ ФИГ. 41), в то время как контрольные антитела CD3xNullxNull не показали значительного связывания с этими клетками. Ни одно из протестированных антител не связывалось с отрицательными клеточными линиями двойного нацеливания MV-4-11 и OCI-AML-3, что свидетельствует о специфичности BGCB491.

20 *BGCB491-опосредованная T-клеточная цитотоксичность клеточных линий MM и активация T-клеток*

Для оценки цитотоксичности и потенциала активации T-клеток BGCB491 *in vitro* использовали анализ T-клеточной цитотоксичности, основанный на методе FACS. BGCB491 тестировали на различных клеточных линиях (двойная положительная линия BCMA-GPRC5D: MM.1S, H929, JIM-3, OPM-2; и двойная отрицательная BCMA-GPRC5D: MV-4-11 и OCI-AML-3) с использованием пан-T-клеток (CD3⁺) от 6 здоровых доноров. Поскольку Fc-рецептор экспрессируется на некоторых исследуемых клетках, в анализ добавляли 2 мг/мл Fc-блокатора. В качестве отрицательных 30 контролей для анализа использовали BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull. BGCB491

эффективно уничтожало двойные положительные клеточные линии BCMA-GPRC5D *in vitro* через 72 часа инкубации (ФИГ. 28А, таблица 24). Было установлено, что BGCB491 является эффективным триспецифическим антителом с диапазоном значений EC₅₀ от 0,002 до 0,312 нМ для цитотоксичности и от 0,008 до 1,070 нМ для активации Т-клеток по показателям живых Т-клеток CD3⁺CD25⁺ во всех двойных целевых положительных клеточных линиях. Как и ожидалось, сопутствующая активация Т-клеток наблюдалась только в отношении положительных клеток двойного нацеливания (ФИГ. 28Б, таблица 24). BGCB491 не вызывало цитотоксичности и активации Т-клеток при тестировании на отрицательных клеточных линиях двойного нацеливания MV-4-11 и OCl-AML-3, что свидетельствует о цитотоксической специфичности. Контроли BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull не показали значительной цитотоксичности, за исключением клеточной линии MM.1S, где антитело CD3xNullxNull проявило некоторую активность при высоких концентрациях (>100 нМ).

Таблица 24. Сводные данные по значениям EC_x для цитотоксичности и активации Т-клеток с использованием Т-клеток от нескольких здоровых доноров

	MM.1S	H929	JIM-3	OPM-2	MV-4-11	OCl-AML-3
Цитотоксичность						
EC ₂₀ (нМ)	0,001	0,002	0,094	0,009	H/A	H/A
EC ₅₀ (нМ)	0,002	0,005	0,312	0,019	H/A	H/A
EC ₉₀ (нМ)	0,012	0,015	2,078	0,058	H/A	H/A
Макс. цитотоксичность (%)	92,580	94,470	61,220	81,320	H/A	H/A
Активации CD3 Т-клеток						
EC ₂₀ (нМ)	0,002	0,002	0,242	0,006	H/A	H/A
EC ₅₀ (нМ)	0,010	0,008	1,070	0,062	H/A	H/A
EC ₉₀ (нМ)	0,145	0,057	11,303	2,726	H/A	H/A
Макс. активация (%)	75,030	85,900	30,850	45,950	H/A	H/A

EC_x х% эффективной концентрации; H/A, неактивно.

Среднее значение EC_x для Т-клеток от 6 доноров для цитотоксичности и активации Т-клеток показаны для каждой клеточной линии. Значения EC_x оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R.

H929 CRISPR-нокаутное поколение клеток и целевая экспрессия

Экспрессия и плотность белков рецепторов BCMA и GPRC5D в H929 CRISPR-нокаутных клеточных линиях

Далее для оценки способности BGCB491 уничтожать клетки, экспрессирующие одну мишень, в анализе цитотоксичности использовали нокаутные клеточные линии H929 с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR) (т. е. H929-BCMA-KO и H929-GPRC5D-KO). Эти клетки были подтверждены последовательностью, как описано в легенде ФИГ. 25, и охарактеризованы на предмет

экспрессии белка методом FACS с использованием коммерческого антитела к BCMA, меченного PE, и антитела к GPRC5D собственного производства, меченного PE. Профили экспрессии показали полный нокаут экспрессии BCMA в клеточной линии H929-BCMA-KO и экспрессии GPRC5D в клеточной линии H929-GPRC5D-KO.

5

BGCB491-опосредованная цитотоксичность клональных клеточных линий H929 CRISPR KO и Т-клеточная активация

Далее антитело BGCB491 тестировали на клеточных линиях CRISPR KO и дикого типа (WT) (т. е. H929-WT, H929-GPRC5D-KO и H929-BCMA-KO) с использованием пан-Т-клеток (CD3+) от 4 здоровых доноров для оценки потенциала клонального истощения с помощью протокола FACS. В качестве отрицательных контролей для анализа использовали BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull. BGCB491 эффективно уничтожало все 3 клеточные линии (H929-WT, H929-GPRC5D-KO и H929-BCMA-KO) и активированные Т-клетки *in vitro* через 72 часа инкубации (Фиг. 29).

Благодаря авидности BGCB491 проявляло значительную эффективность в клетках H929-WT, экспрессирующими двойную мишень, по сравнению с клетками CRISPR KO, экспрессирующими единичную мишень. BCMAxGPRC5DxNull и CD3xNullxNull не демонстрировали значительной цитотоксичности или активации Т-клеток. Среднее значение EC₅₀ для Т-клеток от 4 различных здоровых доноров приведены в таблице 25А. Теклистамаб (биспецифическое антитело BCMAxCD3) и талкетамаб (биспецифическое антитело GPRC5DxCD3) использовали в качестве положительного контроля, и они вели себя в соответствии с ожиданиями. В таблице 25В показаны значения плотности рецептора на клетку в клетках H929.

10

15

20

Таблица 25А. Сводные значения EC₅₀ BGCB491 для цитотоксичности и активации Т-клеток с использованием клеток CRISPR KO H929

Оценка	BGCB491	CD3xNullxNull	BCMAxGPC5DxNull	Теклистама б	Талкетамаб
Цитотоксичность					
H929-WT					
EC ₅₀ (нМ)	0,007	H/A	H/A	0,275	0,243
Макс.	93,012	H/A	H/A	92,072	92,741
цитотоксичность (%)					
H929-GPRC5D-KO					
EC ₅₀ (нМ)	0,330	H/A	H/A	0,198	H/A
Макс.	94,243	H/A	H/A	93,017	H/A
цитотоксичность (%)					
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (нМ)	4,789	H/A	H/A	H/A	0,761
Макс.	65,822	H/A	H/A	H/A	84,664
цитотоксичность (%)					
Активации CD3 Т-клеток					
H929-WT					
EC ₅₀ (нМ)	0,011	H/A	H/A	0,334	0,233
Макс.	82,147	H/A	H/A	80,196	85,399
цитотоксичность (%)					
H929-GPRC5D-KO					
EC ₅₀ (нМ)	0,487	H/A	H/A	0,253	H/A
Макс.	81,084	H/A	H/A	79,450	H/A
цитотоксичность (%)					
H929-BCMA-KO					
EC ₅₀ (нМ)	4,131	H/A	H/A	H/A	0,633
Макс.	63,379	H/A	H/A	H/A	78,888
цитотоксичность (%)					

CRISPR, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; EC₅₀, 50% эффективная концентрация; E : T, соотношение эффектор/мишень; Fc, кристаллизующийся фрагмент; KO, нокаут; H/A, неактивно.

Среднее значение EC₅₀ для Т-клеток от 4 доноров для цитотоксичности и активации Т-клеток показаны для каждой клеточной линии (H929-WT, H929-GPRC5D-KO и H929-BCMA-KO). Значения EC₅₀ оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R. Теклистамаб и талкетамаб использовали в качестве положительных контролей.

Таблица 25В. Плотность рецепторов клеток H929

Клетки		H929-WT	H929-GPRC5D-KO	H929-BCMA-KO
Плотность рецепторов	BCMA	5381	3926	1
	GPRC5D	1574	19	957

Потенциал цитотоксичности и Т-клеточной активации BGCB491 против клеток H929 двойного нацеливания, введенных в цельную кровь здорового человека (MABEL-анализ)

MABEL-анализ использовали для определения воздействия BGCB491 в более физиологически релевантной среде. В данном случае клетки H929 двойного нацеливания добавляли к здоровой цельной крови человека для установления цитотоксичности, активации Т-клеток и параметров цитокинов. Клеточную линию H929 выбирали на основе ее совместимости в среде из цельной крови человека в течение 48 часов. BGCB491 эффективно уничтожало клетки H929 двойного нацеливания и активированные Т-клетки в этом совместно культивированном анализе цельной крови через 48 часов инкубации (ФИГ. 30). BGCB491 показало среднее значение EC_{50} 0,274 нМ для цитотоксичности и 0,376 нМ для $CD3^+$ Т-клеточной активации при испытании с использованием цельной крови 7 различных здоровых доноров (таблица 26). BCMAxGPC5DxNull и $CD3xNullxNull$ не демонстрировали значительной цитотоксичности или активации Т-клеток. Количественное определение цитокинов проводили по 10-плексному протоколу Meso Scale Discovery (MSD) из цельной крови 3 различных доноров (ФИГ. 31, таблица 27). Положительные контроли теклистамаб и талкетамаб продемонстрировали специфическую активность.

Таблица 26. Значения EC_{50} цитотоксичности и активации Т-клеток (нМ) для анализа MABEL

	BGCB491	CD3x Null x Null	BCMA x GPC5D x Null	Теклистамаб	Талкетамаб
Цитотоксичность					
EC_{20}	0,063 (0,027, 0,146)	H/A	H/A	1,273 (0,715, 2,268)	1,272 (0,843, 1,919)
EC_{30}	0,112 (0,049, 0,253)	H/A	H/A	1,549 (0,877, 2,733)	1,744 (1,186, 2,566)
EC_{50}	0,274 (0,123, 0,612)	H/A	H/A	2,106 (1,196, 3,707)	2,866 (1,978, 4,151)
EC_{90}	2,804 (1,142, 6,883)	H/A	H/A	4,675 (2,513, 8,699)	10,379 (6,471, 16,646)
Макс.	49,765 (41,946, 57,583)	H/A	H/A	50,309 (41,780, 58,837)	44,761 (35,940, 53,582)
Активация $CD3^+$ Т-клеток					
EC_{20}	0,042 (0,018, 0,098)	H/A	H/A	1,043 (0,692, 1,574)	0,677 (0,436, 1,050)
EC_{30}	0,098 (0,043, 0,223)	H/A	H/A	1,378 (0,926, 2,051)	0,927 (0,624, 1,377)
EC_{50}	0,376 (0,168, 0,839)	H/A	H/A	2,135 (1,446, 3,152)	1,521 (1,052, 2,199)
EC_{90}	12,150 (4,684, 31,514)	H/A	H/A	6,641 (4,249, 10,378)	5,491 (3,196, 9,436)
Макс.	43,685 (34,087, 53,282)	H/A	H/A	37,993 (31,416, 44,570)	40,780 (33,202, 48,357)
Активация $CD4^+$ Т-клеток					
EC_{20}	0,031 (0,013, 0,071)	H/A	H/A	0,830 (0,529, 1,302)	0,585 (0,370, 0,924)
EC_{30}	0,069 (0,030, 0,156)	H/A	H/A	1,124 (0,733, 1,725)	0,812 (0,540, 1,220)
EC_{50}	0,248 (0,110, 0,556)	H/A	H/A	1,814 (1,199, 2,744)	1,361 (0,934, 1,982)
EC_{90}	6,820 (2,815, 16,522)	H/A	H/A	6,263 (3,781, 10,375)	5,191 (2,921, 9,224)
Макс.	52,423 (44,614, 60,232)	H/A	H/A	48,005 (41,702, 54,308)	52,079 (45,784, 58,374)
Активация $CD8^+$ Т-клеток					
EC_{20}	0,034 (0,016, 0,071)	H/A	H/A	0,903 (0,632, 1,291)	0,506 (0,337, 0,760)
EC_{30}	0,068 (0,034, 0,138)	H/A	H/A	1,189 (0,840, 1,683)	0,693 (0,472, 1,018)

EC ₅₀	0,206 (0,105, 0,406)	H/A	H/A	1,831 (1,300, 2,577)	1,137 (0,784, 1,648)
EC ₉₀	3,674 (1,550, 8,708)	H/A	H/A	5,610 (3,837, 8,201)	4,102 (2,585, 6,508)
Макс.	61,800 (51,931, 71,669)	H/A	H/A	63,628 (57,194, 70,062)	66,038 (59,506, 72,571)

EC_x х% эффективной концентрации; E : T, соотношение эффектор/мишень; MABEL, минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта; Макс., максимальное значение; H/A, неактивно.

BGCB491 добавляли в цельную кровь в различных концентрациях в присутствии клеток-мишеней (H929) и инкубировали в течение 48 часов. Клетки-мишени помещали в цельную кровь при оптимальном соотношении E : T 5 : 1. Исследование проводили с использованием 7 образцов цельной крови здорового донора-человека (ID донора: 10145, 10403, 10420, 10083, 10463, 10493 и 10145). Значения EC_x оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы (указанные в скобках) рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R. Максимальные значения цитотоксичности/активации представлены в процентах.

Таблица 27. Индивидуальные значения EC₅₀ цитокина для анализа MABEL.

Цитокин	BGCB491		Теклистамаб		Талкетамаб	
	EC ₅₀ (нМ)	Макс (95% ДИ) (пг/мл)	EC ₅₀ (нМ)	Макс (95% ДИ) (пг/мл)	EC ₅₀ (нМ)	Макс (95% ДИ) (пг/мл)
INF-γ	0,172	24 856,5	0,994	32 357,6	2,144	35 384,7
TNF-α	0,398	886,8	1,721	819,9	3,474	935,7
IL-1β	0,156	36,5	1,621	35,1	1,336	30,2
IL-2	0,585	1385,4	1,409	1270,2	3,911	1725,4
IL-4	0,156	14,4	1,529	15,1	1,408	11,9
IL-6	0,104	572,3	1,235	549,8	1,209	440,7
IL-10	0,924	472,6	7,694	495,6	1,2	365,8
IL-13	0,254	144,4	0,769	146,3	0,832	145,7

95% ДИ, 95% доверительный интервал; EC₅₀, 50% эффективная концентрация; IL — интерлейкин; INF — интерферон; MABEL, минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта; Макс., максимальная концентрация; MSD, Meso Scale Discovery; TNF, фактор некроза опухоли. Супернатанты клеток H929 из вышеуказанного эксперимента цитотоксичности (ФИГ. 30, 3 Т-клеточных донора) собирали и анализировали на уровни цитокинов с использованием мультиплексного анализа на основе MSD (№ по каталогу: K15049D). Максимальные уровни цитокинов выражали в виде пг/мл (с 95% доверительными интервалами, указанными в скобках).

BGCB491-опосредованная цитотоксичность CD138⁺ клеток костного мозга пациентов с ММ

Для оценки эффективности BGCB491 в первичных образцах, полученных от больных ММ, это триспецифическое mAb тестировали в ходе анализа цитотоксичности с использованием замороженных мононуклеарных клеток костного мозга от 4-х различных больных ММ и Т-клеток от здорового донора. Равные количества экзогенных Т-клеток и мононуклеарных клеток костного мозга (т.е. 100 000; соотношение E : T = 1 : 1) смешивали и инкубировали с BGCB491, CD3xNullxNull, теклистамабом или талкетамабом в течение 48 часов. Опосредованное антителом истощение плазмочитов и потенциал активации Т-клеток измеряли с помощью метода проточной цитометрии. BGCB491 вызывало дозозависимое истощение CD138⁺ плазматических клеток во всех образцах от пациентов после 48 часов совместного культивирования с здоровыми нормальными Т-клетками (ФИГ. 32). Как и ожидалось,

данные по Т-клеточной активации хорошо коррелируют с данными по цитотоксичности. Эти данные подтверждают, что BGCB491 является цитотоксическим по отношению к клеткам костного мозга ММ в анализе совместного культивирования *ex vivo*. Значения EC_{50} , характерные для доноров, для истощения плазматических клеток и активации Т-клеток приведены в таблице 28. Контрольное антитело к CD3хNullхNull было протестировано в 3 образцах, которые имели достаточное количество клеток для всех 4 молекул, и демонстрировало некоторую минимальную неспецифическую деплецию плазмоцитов и активацию Т-клеток при более высоких концентрациях (>1 нМ). Теклистамаб и талкетамаб использовали в качестве положительных контролей, они продемонстрировали ожидаемое поведение.

Таблица 28. Сводные значения EC_{50} BGCB491 для цитотоксичности и активации Т-клеток с использованием первичных моноклеарных клеток костного мозга ММ

EC_{50}	Цитотоксичность			Активация Т-клеток		
	BGCB491	Теклистамаб	Талкетамаб	BGCB491	Теклистамаб	Талкетамаб
Моноклеарные клетки костного мозга, ID: 626						
EC_{20} (нМ)	0,281	0,164	0,080	0,062	0,196	0,081
EC_{30} (нМ)	0,598	0,242	0,169	0,139	0,320	0,126
EC_{50} (нМ)	1,961	0,443	0,545	0,488	0,689	0,255
EC_{90} (нМ)	42,630	2,138	11,300	12,760	5,047	1,582
Моноклеарные клетки костного мозга, ID: 649						
EC_{20} (нМ)	0,345	0,111	0,387	0,005	0,090	0,068
EC_{30} (нМ)	0,650	0,200	0,713	0,028	0,201	0,118
EC_{50} (нМ)	1,762	0,506	1,858	0,381	0,712	0,278
EC_{90} (нМ)	23,400	5,599	22,310	330,900	19,050	2,586
Моноклеарные клетки костного мозга, ID: 652						
EC_{20} (нМ)	0,073	~0,6316	0,304	0,005	0,106	0,015
EC_{30} (нМ)	0,108	~0,7015	0,482	0,009	0,137	0,024
EC_{50} (нМ)	0,202	~0,7440	0,990	0,019	0,204	0,051
EC_{90} (нМ)	1,017	~0,9663	6,421	0,153	0,576	0,334
Моноклеарные клетки костного мозга, ID: 653						
EC_{20} (нМ)	0,071	0,114	0,203	0,013	0,033	0,028
EC_{30} (нМ)	0,145	0,223	0,482	0,030	0,064	0,058
EC_{50} (нМ)	0,446	0,641	1,877	0,120	0,179	0,181
EC_{90} (нМ)	8,183	9,900	63,680	4,355	2,627	3,407
Средн. значение						
EC_{20} (нМ)	0,192	0,130	0,244	0,021	0,106	0,048
EC_{30} (нМ)	0,375	0,222	0,461	0,051	0,180	0,082
EC_{50} (нМ)	1,093	0,530	1,317	0,252	0,446	0,191
EC_{90} (нМ)	18,808	5,879	25,928	87,042	6,825	1,977

КМ, костный мозг; EC_{50} х% эффективной концентрации; Е : Т, соотношение эффектор/мишень; ММ — множественная миелома; МNC — моноклеарная клетка. BGCB491 добавляли в моноклеарные клетки костного мозга ММ в различных концентрациях в присутствии здоровых Т-клеток в соотношение Е : Т 1 : 1 и инкубировали в течение 48 часов. Исследование проводили с использованием 4 образцов костного мозга пациентов с ММ (ID донора: ММ BM MNC-626, 649, 652 и 653). В этом эксперименте в качестве положительного контроля использовали теклистамаб и талкетамаб. Значения EC_{50} оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R.

Потенциал цитотоксичности BGCB491 при различных соотношениях Е : Т и времени инкубации

Кроме того, потенциал цитотоксичности клеток-мишеней BGCB491 был

5 проверен с помощью анализа Т-клеточной цитотоксичности при различных соотношениях Е : Т и разном времени инкубации, чтобы понять его способность истощать клетки миеломы в клинических условиях. В качестве исследуемых клеточных

линий клетки H929 смешивали с Т-клетками (ID донора: 20063323) для достижения соотношения Е : Т 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1 и 0,5 : 1 в присутствии BGCB491,

10 BCMAxGPRC5DxNull, and CD3xNullxNull и инкубировали в течение 72 часов. Для эксперимента с временным интервалом были выбраны соотношения Е : Т 3 : 1 и 1 : 1 для тестирования через 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 часов инкубации. Плотность рецепторов на клетку для BCMA и GPRC5D составляет 5381 и 1574 соответственно в

клетках H929. BGCB491 эффективно уничтожало клетки H929 при всех

15 протестированных соотношениях Е : Т с сопоставимыми значениями EC_{50} для цитотоксичности и для активации Т-клеток (ФИГ. 33А, таблица 29). BGCB491 инициировало цитотоксичность клеток-мишеней с самой ранней временной точки тестирования (24 часа), и сила и эффективность увеличивались с течением времени до

72 часов инкубации, где было практически достигнуто плато (ФИГ. 33Б). BGCB491

20 эффективно уничтожало клетки H929 во всех протестированных временных точках со значениями EC_{50} в диапазоне от 0,001 до 0,022 нМ для цитотоксичности и от 0,005 до 0,067 нМ для активации Т-клеток (соотношение Е : Т 3 : 1). При анализе соотношения Е : Т 1 : 1 значения EC_{50} варьировались от 0,004 до 0,025 нМ для цитотоксичности и от 0,006 до 0,083 нМ для активации Т-клеток (ФИГ. 33Б, таблица 30). Эти данные

25 указывают на то, что триспецифическое mAb BGCB491 является очень эффективным и может быть полезным в ситуациях, когда количество Т-клеток является ограничивающим. Однако при более низком соотношении Е : Т 0,5 : 1 максимальная процентная доля цитотоксичности была намного ниже (~20%), чем при других

условиях, протестированных в течение 72-часового анализа инкубации. Было бы

30 интересно увидеть, может ли более продолжительное время инкубации улучшить максимальную цитотоксичность при этих более низких количествах Т-клеток. В отдельном исследовании BGCB491 продемонстрировало измеримое, низкоаффинное связывание с первичными Т-клетками человека, экспрессирующими CD3 от

нескольких доноров (ФИГ. 26), с устойчивой цитотоксичностью клеток H929 как в соотношениях Е : Т 1 : 1, так и 1 : 3 (ФИГ. 43, ФИГ. 44).

Таблица 29. Сводная информация по значениям ЕС_х BGCB491 для цитотоксичности и активации Т-клеток в анализе соотношения Е : Т

Соотношение Е : Т	ЕС _х	Цитотоксичность	Активация CD3 ⁺ Т-клеток
5 : 1	ЕС ₂₀ (нМ)	0,007	0,008
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,014	0,022
	ЕС ₉₀ (нМ)	0,040	0,097
3 : 1	ЕС ₂₀ (нМ)	0,006	0,005
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,023	0,027
	ЕС ₉₀ (нМ)	0,192	0,343
1 : 1	ЕС ₂₀ (нМ)	0,008	0,004
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,038	0,031
	ЕС ₉₀ (нМ)	0,445	0,993
0,5 : 1	ЕС ₂₀ (нМ)	0,013	0,005
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,088	0,033
	ЕС ₉₀ (нМ)	1,919	0,662

- 5 CD, кластер дифференцировки; ЕС_х х% эффективной концентрации; Е : Т, соотношение эффектор/мишень.
- 10 BGCB491 исследовали в присутствии пан-Т-клеток от 1 здорового донора (ID донора: 20063323) при различных соотношениях Е : Т (5 : 1, 3 : 1, 1 : 1 и 0,5 : 1) в течение 72 часов. Показатели гибели клеток-мишеней и Т-клеточной активации измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности и процентного содержания CD25⁺ CD3⁺ Т-клеток. Значения ЕС_х оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R.

Таблица 30. Сводная информация по значениям ЕС_х BGCB491 для цитотоксичности и активации Т-клеток в анализе с временными интервалами

Конечный показатель	ЕС _х	Время инкубации (ч)						
		24	48	72	96	120	144	168
Соотношение Е : Т 3 : 1								
Цитотоксичность	ЕС ₂₀ (нМ)	0,005	0,002	0,001	0,001	0	0,001	0,001
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,022	0,006	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
	ЕС ₉₀ (нМ)	0,258	0,033	0,007	0,004	0,005	0,004	0,003
Активация CD3 ⁺ Т- клеток	ЕС ₂₀ (нМ)	0,011	0,004	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,067	0,015	0,007	0,006	0,005	0,01	0,008
	ЕС ₉₀ (нМ)	1,255	0,121	0,064	0,087	0,102	0,307	0,385
Соотношение Е : Т 1 : 1								
Цитотоксичность	ЕС ₂₀ (нМ)	0,004	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003
	ЕС ₅₀ (нМ)	0,019	0,025	0,007	0,004	0,004	0,006	0,006
	ЕС ₉₀ (нМ)	0,224	0,585	0,039	0,017	0,013	0,017	0,019
Активация CD3 ⁺ Т- клеток	ЕС ₂₀ (нМ)	0,008	0,004	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003

EC ₅₀ (нМ)	0,083	0,024	0,009	0,006	0,006	0,009	0,01
EC ₉₀ (нМ)	3,117	0,448	0,086	0,047	0,04	0,056	0,066

CD, кластер дифференцировки; EC_x x% эффективной концентрации; E : T, соотношение эффектор/мишень.

Для анализа с временными интервалами BGCB491 тестировали при соотношении E : T 3 : 1 и 1 : 1 в различные моменты времени (24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 часов) с использованием 4 различных доноров Т-клеток (ID донора: 20062105, 20063309, 20061963 и 20063310). Показатели гибели клеток-мишеней и Т-клеточной активации измеряли и выражали в виде процента цитотоксичности и процентного содержания CD25+ CD3+ Т-клеток. Значения EC_x оценивали ретроспективно на основе 4PL-модели со случайным эффектом донора. 95% доверительные интервалы рассчитывали с использованием дельта-метода. Для аппроксимации модели использовали пакет нелинейных смешанных эффектов R.

Влияние BGCB491 на активацию Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней

Чтобы оценить, способствует ли BGCB491 нежелательной активации Т-клеток в отсутствие захвата мишени, было проверено влияние BGCB491 в тесте активации Т-клеток. В первом исследовании 6 образцов нормальных здоровых донорских Т-клеток инкубировали в присутствии различных концентраций BGCB491 в течение 72 часов (ФИГ. 34А). Во втором исследовании использовали более физиологичный формат анализа, при котором BCMA-GPRC5D-позитивные клетки отсутствуют в цельной крови здорового человека, и здесь BGCB491 добавляли в 6 образцов цельной крови нормальных здоровых доноров в различных концентрациях в течение 48 часов (ФИГ. 34Б). Затем измеряли активацию Т-клеток и цитотоксичность путем оценки CD25-положительных CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток или процента клеточной гибели различных клеток крови (ФИГ. 34В; нейтрофилов, моноцитов, В-клеток, НК-клеток, плазмобластов) с помощью проточной цитометрии. BGCB491 не оказывало существенного влияния на активацию Т-клеток или на неспецифическую гибель клеток в отсутствие клеток-мишеней, экспрессирующих BCMA-GPRC5D (ФИГ. 34Б и В). Минимальная активация Т-клеток наблюдалась при концентрациях >10 нМ.

Часть 2. Исследования в условиях in vivo

Противоопухолевую эффективность BGCB491 оценивали в ксенотрансплантатах ММ человека RPMI 8226 (исследование А) и H929-CRISPR-KO (исследование Б). Для создания подходящей среды для приживания человеческих опухолей и человеческих Т-клеток в обоих исследованиях использовали самок мышей NSG (т. е. мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом [*scid*] гамма с диабетом без ожирения [NOD] или NOD.Cg-*Prkdc*^{*scid*} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ).

В исследовании А мышам подкожно клетки RPMI 8226 в день 0. Человеческие Т-клетки были привиты внутрибрюшинно (в/б) на 18 день после вживления

опухолевых клеток. Препараты с носителем, BGCB491, теклистамабом или талкетамабом вводили в/б, начиная с 19 дня и продолжали вводить два раза в неделю, в общей сложности 8 введений. Исследование В проводилось в качестве профилактического исследования путем введения человеческих размноженных пан-Т-клеток в/б в день -1. Клетки H929-BCMA-КО имплантировали п/к в левый бок мышей линии NSG, а клетки H929-GPRC5D-КО — п/к в правый бок в день 0. Лечение носителем (т. е. фосфатно-солевым буфером [PBS]), BGCB491, теклистамабом и тахететамабом начинали на 1 день и вводили два раза в неделю для достижения 7 обработок.

В исследовании А (регрессионная модель) процент Δ ингибирования роста опухоли (TGI) ксенотрансплантатов RPMI 8226 рассчитывался на день 38, когда в исследовании оставалось >70% контрольных животных, обработанных носителем. Плотность рецепторов на клетку для BCMA и GPRC5D составляет 2317 и 486 соответственно в клетках RPMI 8226. Статистически значимое значение Δ TGI наблюдали для BGCB491 при 0,4 мг/кг (эквивалентно приблизительно 8 мкг для 20-граммовой мыши), 1 мг/кг (20 мкг/мышь) и 2,5 мг/кг (50 мкг/мышь), что привело к значениям Δ TGI 90,5%, 106,2% и 111,2% соответственно ($p < 0,05$ для всех групп по сравнению с контролями, получавшими носитель) (ФИГ. 35). Самая низкая доза 0,1 мг/кг (2 мкг/мышь) давала значение Δ TGI 38,4% ($p = 0,035$), что не было эффективным. Теклистамаб подавлял рост опухоли со значением Δ TGI 85% при дозе 0,4 мг/кг, Δ TGI 105,6% при 1 мг/кг и Δ TGI 111,9% при 2,5 мг/кг соответственно по сравнению с мышами в контрольной группе, которым вводили PBS, тогда как талкетамаб при дозе 2,5 мг/кг подавлял рост опухоли RPMI 8226 со значением Δ TGI 77,2% ($p < 0,05$ для всех групп по сравнению с PBS-контролем).

В модели RPMI8226 регрессия опухоли, опосредованная BGCB491, по-прежнему наблюдалась в течение более чем 2 недель после прекращения лечения. Процентную регрессию опухоли по сравнению с исходной опухолевой нагрузкой оценивали на 60-й день, т. е. через 19 дней после введения последней дозы препарата. При использовании BGCB491 в дозах 1 и 2,5 мг/кг наблюдалась регрессия опухоли, в результате чего значения регрессии опухоли составили 80,27% ($p < 0,0001$) и 100% ($p < 0,0001$) соответственно. Доза 0,4 мг/кг давала 28,7% регрессии опухоли на 60-й день, но не была статистически значимой. Теклистамаб аналогичным образом вызывал регрессию опухоли с показателем 68,88% ($p = 0,0025$) при 1 мг/кг и 100% ($p < 0,0001$) при 2,5 мг/кг. В испытаниях *in vitro* с использованием клеток RPMI 8226 в тесте с 72-

часовой инкубацией BGCB491 продемонстрировало сходный профиль цитотоксичности без аддитивного эффекта по сравнению с теклистамабом или талкетамабом при использовании по отдельности.

В исследовании В (профилактическая модель) процент TGI рассчитывали на 22-й день после имплантации опухоли, когда >70% животных оставались в исследовании. Статистически значимое значение TGI против опухолей BCMA-КО наблюдали при использовании BGCB491 в дозах 0,1, 0,25 и 0,5 мг/кг, что приводило к 89,2%, 91,1% и 83,6% TGI соответственно, по сравнению с контрольной группой, обработанной PBS (все p -значения <0,05; ФИГ. 36). Теклистамаб не обладал эффективностью на обоих исследуемых уровнях доз (0,1 мг/кг, 17,2% TGI; и 0,25 мг/кг, 19,9% TGI), в то время как талкетамаб подавлял рост опухоли на 100% как в дозе 0,1 мг/кг, так и 0,25 мг/кг (p <0,05). Против опухолей GPRC5D-КО лечение BGCB491 привело к значительной эффективности со 100% TGI при дозах 0,1, 0,25 и 0,5 мг/кг (p <0,05 для всех групп). Доза 0,025 мг/кг имела незначительный эффект 22,09% TGI, который не считали биологически значимым (34). Теклистамаб подавлял рост опухоли H929-GPRC5D-КО на 100% TGI как в дозе 0,1, так и 0,25 мг/кг (p <0,05), талкетамаб не оказывал никакого влияния. Плотность рецепторов на клетку для BCMA и GPRC5D составляет 1 и 957 соответственно в клетках H929 BCMA-КО. Плотность рецепторов на клетку для BCMA и GPRC5D составляет 3926 и 19 соответственно в клетках H929 GPRC5D-КО.

Наблюдение за животными после лечения проводилось до появления признаков реакции трансплантата против хозяина (GvHD), после чего животные подверглись эвтаназии, а исследование было завершено.

Таким образом, триспецифическое mAb BGCB491 проявляло эффективность в отношении многочисленных клеточных линий MM и было способно истощать клональную популяцию, экспрессирующую как одиночные, так и двойные мишени. BGCB491 также было способно уничтожать клетки, экспрессирующие мишень, в более физиологических условиях, например при анализе цельной крови. Важно отметить, что BGCB491 способно истощать плазматические клетки MM дозозависимым образом. Эффективность BGCB491 выражалась также в значительном снижении роста опухолей в моделях ксенотрансплантатов у мышей *in vivo*. Наконец, не было продемонстрировано неспецифической активации Т-клеток или цитотоксичности целевых отрицательных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что BGCB491 может обладать значительным терапевтическим потенциалом в лечении больных MM.

В дальнейшем исследовании *in vivo* противоопухолевую эффективность BGCB491 оценивали на ксенотрансплантатах MM.1S (исследование С) человека. Для создания подходящей среды для приживания человеческих опухолей и человеческих Т-клеток в исследовании использовали самок мышей NSG (т. е. мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом [*scid*] гамма с диабетом без ожирения [NOD] или NOD.Cg-*Prkdc*^{*scid*} *Il2rg*^{TM1Wjl}/SzJ).

В исследовании С мышам подкожно имплантировали клетки MM.1S в день 0. На 13-й день после приживания опухолевых клеток внутрибрюшинно (в/б) прививали человеческие размноженные пан-Т-клетки, а начиная с 15-го дня вводили в/б препараты с носителем, BGCB491, теклистамабом или талкетамабом и продолжали вводить два раза в неделю для проведения в общей сложности 7 введений.

Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали на 34-й день после имплантации опухоли, когда >70% животных оставались в исследовании.

Статистически значимое значение TGI против опухолей MM.1S наблюдали при использовании BGCB491 в дозах 0,025, 0,1, 0,5 и 1 мг/кг, что приводило к 66,9%, 91,2%, 99,7% и 100% TGI соответственно, по сравнению с контрольной группой, обработанной PBS (все *p*-значения <0,05; **ФИГ. 45**). Теклистамаб подавлял рост опухоли на обоих исследуемых уровнях доз (0,1 мг/кг, 73,7% TGI; и 0,5 мг/кг, 92,3% TGI (*p*<0,05). Талкетамаб оказался эффективным: 90,9% TGI при дозе 0,025 мг/кг и 99,4% при дозе 0,1 мг/кг (*p*<0,05).

BGCB491-опосредованная регрессия опухоли в течение 2 недель после прекращения лечения. Процентную регрессию опухоли по сравнению с исходной опухолевой нагрузкой оценивали на 51-й день, т. е. через 14 дней после введения последней дозы препарата. При использовании BGCB491 в дозах 0,5 и 1 мг/кг наблюдали регрессию опухоли, что привело к значениям регрессии опухоли, равным 100% (8 из 8 случаев полной регрессии установленных опухолей). Доза 0,4 мг/кг давала 28,7% регрессии опухоли на 60-й день, но не была статистически значимой. Теклистамаб не вызывал какой-либо регрессии опухоли, но талкетамаб в дозе 0,1 мг/кг приводил к 100% регрессии установленных опухолей MM.1S.

Пример 12. Аффинность терапевтического средства к человеку и другим видам

CD3-связывающее плечо (т. е. CD3B376) связывается с CD3 яванского макака. Вкратце, связывание измеряли методом проточной цитометрии после инкубации моноклеарных клеток периферической крови человека и яванского макака с

помощью GCDB381 (т. е. CD3B376 Fab в бивалентном антителе IgG1-AAS), CD3B891 (т. е. CD3B376xNull, биспецифическое антитело IgG1-AAS) или нулевого контроля.

BCMA-связывающее плечо (BCMB601, содержащий scFv BCMB519) не связывался с BCMA яванского макака (таблица 19А).

5 GPRC5D- (т. е. GC5B680) и BCMA-связывающие плечи оценивали на перекрестную реактивность в отношении яванских макаков в качестве части молекулы BGCB463, в которой используются идентичные BGCB491 плечи связывания. Перекрестная реактивность в отношении яванских макаков была определена для обоих связывающих мишень плеч scFv с помощью FACS-анализа, основанного на связывании
10 клеток при 37 °C в течение 1 часа с клетками K562, стабильно экспрессирующими GPRC5D или BCMA человека или яванского макака. Значение EC₅₀ для scFv-плеча GC5B680 на клеточном уровне составило около 30 нМ против клеток, экспрессирующих GPRC5D человека, и примерно в 10 раз слабее (около 400 нМ) на клетках яванского макака, экспрессирующих GPRC5D. Напротив, значение клеточной
15 EC₅₀ для scFv-плеча BCMB519 составило около 145 нМ для BCMA человека, в то время как связывание с BCMA яванского макака не обнаруживалось вплоть до 2 мкМ.

Пример 13. Оценка нецелевой токсичности

Возможность риска, связанного с внецелевым связыванием или функциональной активностью, ассоциированной со связывающими опухолевый антиген плечами, оценивалась с помощью клеточного микрочипа Retrogenix™ (внецелевого связывания не наблюдалось) и функционально-селективного анализа клеточных линий TAA⁻ соответственно.

25 Селективность CD3-плеча BGCB491 была продемонстрирована отсутствием цитотоксичности и активации Т-клеток в отсутствие клеток, экспрессирующих мишень (ФИГ. 34А–34В; см. пример 12).

Оценка нецелевого связывания GPRC5D

30 Связывающее GPRC5D (GC5B1257.001, анти-GPRC5D GC5B680 scFv-Fc) при скрининге на связывание с фиксированными клетками HEK293, индивидуально экспрессирующими библиотеку из 5868 полноразмерных белков плазматической мембраны человека и секретируемых белков человека, связанных с клеточной поверхностью (включая все известные члены группы 5 семейства С сопряженные с G-белком рецепторы [GPRC5]) и 371 гетеродимера, было определено как специфически связывающееся со своей основной мишенью, GPRC5D. Внецелевых взаимодействий

выявлено не было, что свидетельствует о целевой специфичности GPRC5D-связывающего домена, содержащегося в BGCB491.

Оценка нецелевого связывания ВСМА

Связующее ВСМА (BCMB601.001, анти-ВСМА BCMB519 scFv-Fc) при скрининге на связывание с фиксированными клетками HEK293, индивидуально экспрессирующими библиотеку из 5475 полноразмерных белков плазматической мембраны человека и секретируемых белков человека, связанных с клеточной поверхностью и 371 гетеродимера, было определено как специфически связывающееся со своей основной мишенью, ВСМА (TNFRSF17). Внецелевых взаимодействий выявлено не было, что свидетельствует о целевой специфичности ВСМА-связывающего домена, содержащегося в BGCB491.

Функциональная селективность в антиген-негативных клеточных линиях, связанных с опухолью

Антиген-специфичность BGCB491 дополнительно определена в функциональном анализе *in vitro* с использованием панели из 5 линий раковых клеток, в которых отсутствует экспрессия GPRC5D, ВСМА и CD3 (что подтверждено проточной цитометрией), но по данным транскриптомики экспрессируется >50% известных белков клеточной поверхности. В исследованиях сокультур со здоровыми донорскими Т-клетками BGCB491 оценивается на предмет индукции антителозависимого, опосредованного Т-клетками высвобождения цитокинов гранзима В, интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли (TNF)- α и интерлейкина (IL)-2 при добавлении в сокультуры с клетками-мишенями, экспрессирующими GPRC5D и ВСМА (т.е. клетки H929). Эти данные могут подтвердить антиген-специфичность BGCB491 к GPRC5D и ВСМА.

Пример 14. Переносимость в месте введения

Кожные реакции оценивали в исследовании ФК у минипигов, получавших 0,1 или 0,01 мг/кг BGCB491 п/к в объеме от 2 до 2,5 мл при концентрации 0,05 и 0,5 мг/мл соответственно (см. фармакокинетику на геттингенских минипигах в примере 16).

Кожных реакций не наблюдалось.

Пример 15. Фармакокинетика у доклинических видов

Фармакокинетика у мышей

Фармакокинетические свойства BGCB491 в сыворотке крови и опухоли охарактеризованы на модели ксенотрансплантата NSG MM.1S после однократного внутривенного введения в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг.

Фармакокинетика у яванского макака

Фармакокинетические свойства BGCB491 были охарактеризованы после исследования ФК однократной дозы без GLP у яванских макаков ($n = 3$). BGCB491 вводили в/в яванским макакам в дозе 0,5 мг/кг (10 mM гистидин, pH 6,5). Для количественного определения концентраций BGCB491 использовали квалифицированный электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ECLIA) от MSD. Системное воздействие препарата BGCB491, оцениваемое по максимальной концентрации в сыворотке крови ($C_{\max}$) и площади под кривой зависимости концентрации в сыворотке крови от времени (AUC) для 1-дозового интервала, представлено в таблице 31, а концентрация BGCB491 в сыворотке крови проиллюстрирована на ФИГ. 37.

Таблица 31. Индивидуальные и средние (SD) значения параметров ФК BGCB491 после однократной в/в дозы 0,5 мг/кг у яванских макаков (группа 2; $n = 3$ /группу)

ID	$C_{\max}$ (мкг/мл)	ППК _{посл} (мкг день/мл)	AUC _{inf} (мкг день/мл)	CL (мл/день/кг)	V_z (мл/кг)	$T_{1/2}$ (дни)
2501	9,39	35,61	35,81	13,96	74,51	3,70
2502	8,49	32,73	32,95	15,17	137,01	6,26
2503	9,22	47,95	48,74	10,26	126,52	8,55
Среднее	9,03	38,76	39,17	13,13	112,68	6,17
CO	0,48	8,08	8,41	2,56	33,47	2,43

AUC_{inf}, площадь под кривой «концентрация-время» в сыворотке крови с экстраполяцией до бесконечности; AUC_{last}, площадь под кривой «концентрация-время» в сыворотке крови до последней точки выборки; CL, системный клиренс; $C_{\max}$, максимальная концентрация в сыворотке; в/в, внутривенно; ФК, фармакокинетика; CO, стандартное отклонение; $T_{1/2}$, период полувыведения терминальной фазы; V_z , общий системный клиренс.

Фармакокинетика у гёттингенских минипигов

Фармакокинетические свойства BGCB491 были охарактеризованы после исследования ФК однократной дозы без GLP у гёттингенских минипигов ($n = 4$ /группу). BGCB491 вводили в/в в дозе 0,1 мг/кг или п/к в дозе 0,1 или 0,01 мг/кг (10 mM гистидин, pH 6,5). Для количественного определения концентраций общего BGCB491 использовали квалифицированный анализ ECLIA от MSD. Для оценки

параметров скорости абсорбции (k_a) и p/k биодоступности (F) для BGCB491 использовали исследование ФК у минипигов. Воздействие лекарственного средства ($C_{\max}$ и $AUC_{\inf}$) увеличивалось с увеличением дозы примерно дозопропорционально в диапазоне доз от 0,01 до 0,1 мг/кг. Системное воздействие препарата BGCB491, оцениваемое по $C_{\max}$ и AUC для 1-дозового интервала, представлено в таблице 32, а концентрации BGCB491 в сыворотке крови проиллюстрированы на ФИГ. 39А.

Таблица 32. Индивидуальные и средние (SD) значения параметров ФК BGCB491 после введения однократной дозы BGCB491 самцам минипигов (n = 4/группу)

ID	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$T_{\max}$ ^a (дни)	ППК _{посл} (мкг день/мл)	$AUC_{\inf}$ (мкг день/мл)	CL (мл/день/кг)	V_z (мл/кг)	$T_{1/2}$ (дни)
Группа 1. 0,01 мг/кг п/к							
1001	0,0512	2,00	0,9688	1,3280	—	—	15,80
1002	0,0515	0,25	0,3699	0,5884	—	—	6,73
1003	0,0473	3,00	0,5145	1,0341	—	—	12,54
1004	0,0587	1,00	0,5769	0,9630	—	—	10,12
Среднее	0,0522	1,50	0,6075	0,9784	—	—	11,30
СО	0,0047	0,25-3,00	0,2560	0,3042	—	—	3,83
Группа 2. 0,1 мг/кг п/к							
2001	0,6308	2,00	10,1287	13,5595	—	—	15,22
2002	0,6264	2,00	7,1009	9,1614	—	—	8,23
2003	0,4533	7,00	5,4560	7,9707	—	—	9,52
2004	0,4717	4,00	5,9607	11,4536	—	—	14,90
Среднее	0,5455	3,00	7,1616	10,5363	—	—	11,97
СО	0,0962	2,00-7,00	2,0943	2,4802	—	—	3,61
Группа 3. 0,1 мг/кг в/в							
3001	1,6311	—	6,1690	8,5061	11,7563	97,0290	5,72
3002	1,8074	—	13,3265	20,4865	4,8813	154,0263	21,87
3003	1,8519	—	6,7074	9,8693	10,1324	95,3027	6,52
3004	1,6333	—	11,7039	16,0389	6,2348	148,9873	16,56
Среднее	1,7309	—	9,4767	13,7252	8,2512	123,8363	12,67
СО	0,1154	—	3,5773	5,5730	3,2273	32,0250	7,87

$AUC_{\inf}$, площадь под кривой «концентрация-время» в сыворотке крови с экстраполяцией до бесконечности; AUC_{last} , площадь под кривой «концентрация-время» в сыворотке крови до последней точки выборки; CL, системный клиренс; $C_{\max}$, максимальная концентрация в сыворотке; в/в, внутривенно; ФК, фармакокинетика; СО, стандартное отклонение; $T_{1/2}$, период полувыведения терминальной фазы; $T_{\max}$, время до максимальной концентрации в сыворотке; V_z , общий системный клиренс.

Экстраполированные AUC составляли >20% для всех животных.

^a Медиана и диапазон представлены для $T_{\max}$.

Справочная литература

- 1 Ridgway, J. B., Presta, L. G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody
CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* **9**, 617-621,
5 doi:10.1093/protein/9.7.617 (1996).
- 2 Tustian, A. D., Endicott, C., Adams, B., Mattila, J. & Bak, H. Development of
purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of
protein A binding avidity. *MAbs* **8**, 828-838, doi:10.1080/19420862.2016.1160192
(2016).
- 10 3 Von Kreudenstein, T. S. et al. Improving biophysical properties of a bispecific antibody
scaffold to aid developability: quality by molecular design. *MAbs* **5**, 646-654,
doi:10.4161/mabs.25632 (2013).
- 4 De Groot, A. S. & Martin, W. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less
immunogenic protein therapeutics. *Clinical immunology* **131**, 189-201,
15 doi:10.1016/j.clim.2009.01.009 (2009).
5. Usmani SZ, Berdeja JG, Truppel-Hartmann A, et al. KarMMA-4: Idecabtagene vicleucel
(ide-cel, bb2121), a BCMA-directed CAR T-cell therapy in high-risk newly diagnosed
multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2021;39(15_suppl):TPS8053. doi:
10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS8053
- 20 6. Berdeja JG, Krishnan AY, Oriol A, et al. Updated results of a phase 1, first-in-human
study of talquetamab, a G protein-coupled receptor family C group 5 member D
(GPRC5D) x CD3 bispecific antibody, in relapsed/refractory multiple myeloma (MM). *J*
Clin Oncol. 2021;39(15_suppl):8008. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8008
7. Usmani SZ, Berdeja JG, Madduri D, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation
25 antigen (BCMA)-directed chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy, in
relapsed/refractory multiple myeloma (R/R MM): updated results from CARTITUDE-1.
J Clin Oncol. 2021;39(15_suppl):8005. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8005
8. Maus MV, June CH. Zoom Zoom: racing CARs for multiple myeloma. *Clin Cancer Res.*
2013;19(8):1917-1919. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0168
- 30 9. Darce JR, Arendt BK, Chang SK, Jelinek DF. Divergent effects of BAFF on human
memory B cell differentiation into Ig-secreting cells. *J Immunol.* 2007;178(9):5612-5622.
doi:10.4049/jimmunol.178.9.5612
10. Tai YT, Anderson KC. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma.
Immunotherapy. 2015;7(11):1187-1199. doi:10.2217/imt.15.77
- 35 11. Patel DR, Wallweber HJ, Yin J, et al. Engineering an APRIL-specific B cell maturation
antigen. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16727-16735. doi:10.1074/jbc.M312316200
12. Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn PH, et al. γ -Secretase directly sheds the survival
receptor BCMA from plasma cells. *Nat Commun.* 2015;6:7333. Published 2015 Jun 11.
doi:10.1038/ncomms8333
- 40 13. Pillarisetti K, Powers G, Luistro L, et al. Teclistamab is an active T cell-redirecting
bispecific antibody against B-cell maturation antigen for multiple myeloma. *Blood Adv.*
2020;4(18):4538-4549. doi:10.1182/bloodadvances.2020002393

14. Sanchez E, Li M, Kitto A, et al. Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol*. 2012;158(6):727-738. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09241.x
- 5 15. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(3):290-296. doi:10.1038/icb.2014.93
16. Strohl WR, Naso M. Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor (CAR)-T cells as approaches to kill cancer cells. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(3):41. Published 2019 Jul 3. doi:10.3390/antib8030041
- 10 17. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020;34(4):985-1005. doi:10.1038/s41375-020-0734-z
- 15 18. Bräuner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, Brodin B, Krogsgaard-Larsen P, O'Hara P. Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518(3):237-248. doi:10.1016/s0167-4781(01)00197-x
19. Atamaniuk J, Gleiss A, Porpaczy E, et al. Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(9):953-960. doi:10.1111/j.1365-2362.2012.02679.x
- 20 20. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M, et al. Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(9):1336-1340. doi:10.1182/blood-2013-09-529800
21. Smith EL, Harrington K, Staehr M, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2019;11(485):eaau7746. doi:10.1126/scitranslmed.aau7746
- 25 22. Pillarisetti K, Edavettal S, Mendonça M, et al. A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma. *Blood*. 2020;135(15):1232-1243. doi:10.1182/blood.2019003342
23. Verkleij CPM, Broekmans MEC, van Duin M, et al. Preclinical activity and determinants of response of the GPRC5DxCD3 bispecific antibody talquetamab in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2021;5(8):2196-2215. doi:10.1182/bloodadvances.2020003805
- 30 24. Kodama T, Kochi Y, Nakai W, et al. Anti-GPRC5D/CD3 bispecific T-cell-redirecting antibody for the treatment of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(9):1555-1564. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1216
- 35 25. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2048-2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422
26. Seckinger A, Delgado JA, Moser S, et al. Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer Cell*. 2017;31(3):396-410. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.002
- 40 27. Inoue S, Nambu T, Shimomura T. The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. *J Invest Dermatol*. 2004;122(3):565-573. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.12628.x

28. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117(18):4691-4695. doi:10.1182/blood-2010-10-299487
29. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol*. 2007;18 Suppl 1:i3-i8. doi:10.1093/annonc/mdl443
30. Michels TC, Petersen KE. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2017;95(6):373-383.
31. Gandhi UH, Cornell RF, Lakshman A, et al. Outcomes of patients with multiple myeloma refractory to CD38-targeted monoclonal antibody therapy. *Leukemia*. 2019;33(9):2266-2275. doi:10.1038/s41375-019-0435-7
32. Dimopoulos MA, San-Miguel J, Belch A, et al. Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of POLLUX. *Haematologica*. 2018;103(12):2088-2096. doi:10.3324/haematol.2018.194282
33. Kumar SK, Callander NS, Adekola K, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(12):1685-1717. Published 2020 Dec 2. doi:10.6004/jnccn.2020.0057
34. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 2001;84(10):1424-1431. doi:10.1054/bjoc.2001.1796
35. Chiu A, Xu W, He B, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109(2):729-739. doi:10.1182/blood-2006-04-015958
36. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JJ, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells [published correction appears in *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(7):1069]. *J Clin Invest*. 2003;112(2):286-297. doi:10.1172/JCI18025
37. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004;199(1):91-98. doi:10.1084/jem.20031330
38. Bu DX, Singh R, Choi EE, et al. Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2018;9(40):25764-25780. Published 2018 May 25. doi:10.18632/oncotarget.25359
39. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2048-2060. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422
40. Laâbi Y, Gras MP, Carbonnel F, et al. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J*. 1992;11(11):3897-3904.
41. Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(7):1147-1154. doi:10.1093/nar/22.7.1147
42. Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204:43-54. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00219.x

43. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol.* 2004;173(2):807-817. doi:10.4049/jimmunol.173.2.807
- 5 44. Venkateshaiah SU, Bam R, Li X, Khan S, Ling W, Randal SS, Yaccoby S. GPRC5D is a cell surface plasma cell marker whose expression is high in myeloma cells and reduced following coculture with osteoclasts. *Blood.* 2013;122(21):3099. doi:10.1182/blood.V122.21.3099.3099
- 10 45. Kamperschroer C, Shenton J, Lebrech H, Leighton JK, Moore PA, Thomas O. Summary of a workshop on preclinical and translational safety assessment of CD3 bispecifics. *J Immunotoxicol.* 2020;17(1):67-85. doi:10.1080/1547691X.2020.1729902
46. Li J, Piskol R, Ybarra R, et al. CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity. *Sci Transl Med.* 2019;11(508):eaax8861. doi:10.1126/scitranslmed.aax8861
- 15 47. Leong SR, Sukumaran S, Hristopoulos M, et al. An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;129(5):609-618. doi:10.1182/blood-2016-08-735365
48. Singh A, Dees S, Grewal IS. Overcoming the challenges associated with CD3+ T-cell redirection in cancer. *Br J Cancer.* 2021;124(6):1037-1048. doi:10.1038/s41416-020-01225-5
- 20 49. Jain T, Litzow MR. Management of toxicities associated with novel immunotherapy agents in acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2020;11:2040620719899897. Published 2020 Jan 20. doi:10.1177/2040620719899897
- 25 50. Ling J, Zhou H, Jiao Q, Davis HM. Interspecies scaling of therapeutic monoclonal antibodies: initial look. *J Clin Pharmacol.* 2009;49(12):1382-1402. doi:10.1177/0091270009337134
51. Woo S, Jusko WJ. Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(9):1672-1678. doi:10.1124/dmd.107.015248
- 30 52. Li J, Stagg NJ, Johnston J, et al. Membrane-proximal epitope facilitates efficient T cell synapse formation by anti-FcRH5/CD3 and is a requirement for myeloma cell killing. *Cancer Cell.* 2017;31(3):383-395. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.001
53. ClinicalTrials.gov. NCT02879695: Blinatumomab and nivolumab with or without ipilimumab in treating patients with poor-risk relapsed or refractory CD19+ precursor B-lymphoblastic leukemia. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02879695>. Accessed: 23 June 2021.
- 35 54. Guillerey C, Nakamura K, Pichler AC, et al. Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model. *JCI Insight.* 2019;5(14):e125932. Published 2019 Jun 13. doi:10.1172/jci.insight.125932
- 40

Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок, упоминаемых в данном документе, включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Несмотря на то, что иллюстративные варианты осуществления данного изобретения были конкретным образом представлены и описаны в данном документе, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в данное изобретение могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, без отступления от объема вариантов осуществления данного изобретения, охватываемых прилагаемой формулой изобретения.

Перечень последовательностей

- 5 **SEQ ID NO: 1** LCDR1 CD3B376
 TGTSSNIGTYKFVS
- 10 **SEQ ID NO: 2** LCDR2 CD3B376
 EVSKRPS
- 15 **SEQ ID NO: 3** LCDR3 CD3B376
 VSYAGSGTLL
- 20 **SEQ ID NO: 4** HCDR1 CD3B376
 GDSVFNNNAAWS
- 25 **SEQ ID NO: 5** HCDR2 CD3B376
 RTYYRSKWLYD
- 30 **SEQ ID NO: 6** HCDR3 CD3B376
 GYSSSFYD
- 35 **SEQ ID NO: 7** VL CD3B376
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSG
 VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL
- 40 **SEQ ID NO: 8** VH CD3B376
 QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
 KWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYDWGQG
 TLVTVSS
- 45 **SEQ ID NO: 9** LCDR1 GC5B680
 RSSQSLVHSDGNTYLS
- 50 **SEQ ID NO: 10** LCDR2 GC5B680
 KISNRFF
- 55 **SEQ ID NO: 11** LCDR3 GC5B680
 MQATQFPHT
- 60 **SEQ ID NO: 12** HCDR1 GC5B680
 GFSLTNIRMSVS
- 65 **SEQ ID NO: 13** HCDR2 GC5B680
 HIFSNDEKS
- 70 **SEQ ID NO: 14** HCDR3 GC5B680
 MRLPYGMDV
- 75 **SEQ ID NO: 15** VL GC5B680

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNR
FFGVDPDRFSGSGAGTDFTLTKISRVEAEDVG VYYCMQATQFPHTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 16 VH GC5B680

5 QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDE
KSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARMRLPYGMDVWGQGT
TVVSS

SEQ ID NO: 17 LCDR1 BCMB519

10 RASQSISSSFLT

SEQ ID NO: 18 LCDR2 BCMB519
GASSRAT

15 **SEQ ID NO: 19** LCDR3 BCMB519
QHYGSSPMYT

SEQ ID NO: 20 HCDR1 BCMB519
GFTFSSYAMS

20 **SEQ ID NO: 21** HCDR2 BCMB519
AISGSGGSTY

25 **SEQ ID NO: 22** HCDR3 BCMB519
DEGYSSGHYYGMDV

SEQ ID NO: 23 VL BCMB519
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKLEIK

30 **SEQ ID NO: 24** VH BCMB519
EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDV
WGQGT TVTVSS

35 **SEQ ID NO: 25** линкер
GGSEKSSGSGSESKSTGGS

SEQ ID NO: 26 BGCB463, тяжелая цепь 1

40 QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS
KWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSFDYWGGQ
TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
45 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSEFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 27 BGCB463, легкая цепь 1

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSG
VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN
KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

5

SEQ ID NO: 28 BGCB463, тяжелая цепь 2

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNR
FFGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQATQFPHTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPP
10 GKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARM
RLPYGMDVWGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVS SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC
LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
15 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSEKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPGTLSPG
ERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKLEIKGGSEKSSGSGSESKSTGGSEVQLL
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGYSSGHYYGMDVWGQG
20 TTVTVSS

SEQ ID NO: 29 BGCB491, тяжелая цепь 1

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRITYRS
KWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQG
25 TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVS SVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
30 LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFQTKLSLSLSPGKGGGGSG
GGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQ
RPGQPPRLLIYKISNRFFGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQATQFPH
TFGQGTKLEIKGGSEKSSGSGSESKSTGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFS
LTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNV
35 DPVDTATYYCARMRLPYGMDVWGQGT TVTVSS

SEQ ID NO: 30 BGCB491, легкая цепь

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KRPSG
VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAA
40 PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN
KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 31 BGCB491, тяжелая цепь 2

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
45 DRFSGGGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKLEIKGGSEKSSG
SGSESKSTGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLE
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEGY
SSGHYYGMDVWGQGT TVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVS SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
50 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS

LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **SEQ ID NO: 32** CDR BCMA
SGSYFWG

SEQ ID NO: 33 CDR BCMA
SIYYSGITYYNPSLKS

10 **SEQ ID NO: 34** CDR BCMA
HDGAVAGLFDY

15 **SEQ ID NO: 35** CDR BCMA
SSSYFWG

SEQ ID NO: 36 CDR BCMA
SIYYSGSTYYNPSLKS

20 **SEQ ID NO: 37** CDR BCMA
HDGATAGLFDY

SEQ ID NO: 38 CDR BCMA
SSSYFWG

25 **SEQ ID NO: 39** CDR BCMA
GGNNIGSKSVH

30 **SEQ ID NO: 40** CDR BCMA
DDSDRPS

SEQ ID NO: 41 CDR BCMA
QVWDSSSDHVV

35 **SEQ ID NO: 42** VH BCMA
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGIT
YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

40 **SEQ ID NO: 43** VH BCMA
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGIT
YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

45 **SEQ ID NO: 44** VH BCMA
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGIT
YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

SEQ ID NO: 45 VH BCMA

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGST
YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

5 **SEQ ID NO: 46** VH BCMA

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGIT
YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

10 **SEQ ID NO: 47** VH BCMA

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGRT
YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGT
LVTVSSA

15 **SEQ ID NO: 48** VL BCMA

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGI
PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL

20 **SEQ ID NO: 49** CDR GPRC5D

SYAIS

SEQ ID NO: 50 CDR GPRC5D

NYWMS

25 **SEQ ID NO: 51** CDR GPRC5D

SYFIG

SEQ ID NO: 52 CDR GPRC5D

GYTMN

30

SEQ ID NO: 53 CDR GPRC5D

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 54 CDR GPRC5D

35 GISYSGGSKYYASSVKG

SEQ ID NO: 55 CDR GPRC5D

IIYPGKSDTRYSPSFQG

40 **SEQ ID NO: 56** CDR GPRC5D

LINPYNSDTNYAQLQGG

SEQ ID NO: 57 CDR GPRC5D

ESRWRGYKLD

45

SEQ ID NO: 58 CDR GPRC5D

AAFDGRRRAVRLD

SEQ ID NO: 59 CDR GPRC5D

50 VYSFGGRHKALFDY

SEQ ID NO: 60 CDR GPRC5D
VALRVALDY

5 **SEQ ID NO: 61** CDR GPRC5D
RASQSISSYLN

SEQ ID NO: 62 CDR GPRC5D
RASQSVSSYLA

10 **SEQ ID NO: 63** CDR GPRC5D
KASQNVATHVG

15 **SEQ ID NO: 64** CDR GPRC5D
AASSLQS

SEQ ID NO: 65 CDR GPRC5D
DASNRAT

20 **SEQ ID NO: 66** CDR GPRC5D
SASYRYS

SEQ ID NO: 67 CDR GPRC5D
QQSYSTPLT

25 **SEQ ID NO: 68** CDR GPRC5D
QQRSNWPLT

30 **SEQ ID NO: 69** CDR GPRC5D
QQYNRYPYT

SEQ ID NO: 70 CDR GPRC5D
DYGMH

35 **SEQ ID NO: 71** CDR GPRC5D
SYWIG

SEQ ID NO: 72 CDR GPRC5D
GYAMS

40 **SEQ ID NO: 73** CDR GPRC5D
SYGIS

45 **SEQ ID NO: 74** CDR GPRC5D
GYSFTGYTMN

SEQ ID NO: 75 CDR GPRC5D
SYAMS

50 **SEQ ID NO: 76** CDR GPRC5D

GFSLTSYNVH

SEQ ID NO: 77 CDR GPRC5D
AIKYSGGSTYYADSVKG

5

SEQ ID NO: 78 CDR GPRC5D
GISYSGGSKYYADSVKG

SEQ ID NO: 79 CDR GPRC5D
IIYPGDS DTRYSPSFQG

10

SEQ ID NO: 80 CDR GPRC5D
AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 81 CDR GPRC5D
GIPIFGNINYAQKFQG

15

SEQ ID NO: 82 CDR GPRC5D
LINPYNGDTN

20

SEQ ID NO: 83 CDR GPRC5D
VIWAGGSTNYNSALMS

SEQ ID NO: 84 CDR GPRC5D
RAESGPGLDY

25

SEQ ID NO: 85 CDR GPRC5D
AAWDFGRRAVRLDY

SEQ ID NO: 86 CDR GPRC5D
IGFYGRSFRIFDY

30

SEQ ID NO: 87 CDR GPRC5D
VDRSFGRSRYTLDY

35

SEQ ID NO: 88 CDR GPRC5D
VSRRFKRFAYYFDY

SEQ ID NO: 89 CDR GPRC5D
SNFLPVVFDY

40

SEQ ID NO: 90 CDR GPRC5D
DGIRLRFAY

SEQ ID NO: 91 CDR GPRC5D
KSSQSVLYSSNNKNYLA

45

SEQ ID NO: 92 CDR GPRC5D
RASQSVRKSLA

50

SEQ ID NO: 93 CDR GPRC5D
WASTRES

SEQ ID NO: 94 CDR GPRC5D
TASNRA

SEQ ID NO: 95 CDR GPRC5D
QYYSTPLT

SEQ ID NO: 96 CDR GPRC5D
QYFRAPIT

SEQ ID NO: 97 VH GPRC5D
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGT
ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGYKLDYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 98 VH GPRC5D
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGG
SKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDGRRVRLDY
WGQGT

SEQ ID NO: 99 VH GPRC5D
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIIPGKSD
TRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYW
GQGT

SEQ ID NO: 100 VH GPRC5D
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYN
SDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 101 VL GPRC5D
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 102 VL GPRC5D
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA

SEQ ID NO: 103 VL GPRC5D
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYS
VPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 104 VH GPRC5D
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGG
STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYWGQ
TLVTVSS

SEQ ID NO: 105 VH GPRC5D

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGG
SKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRLD
YWGQGT LVTVSS

5 **SEQ ID NO: 106** VH GPRC5D

EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSD
TRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFRIFDYWGQG
TLVTVSS

10 **SEQ ID NO: 107** VH GPRC5D

EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSD
TRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYW
GQGT LVTVSS

15 **SEQ ID NO: 108** VH GPRC5D

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRSRYTLDYW
GQGT LVTVSS

20 **SEQ ID NO: 109** VH GPRC5D

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGNI
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVSRFRKFAYYFDYWG
QGT LVTVSS

25 **SEQ ID NO: 110** VH GPRC5D

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYN
GDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQ
GT LVTVSS

30 **SEQ ID NO: 111** VH GPRC5D

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVFDYWGQGT
LTVSS

35 **SEQ ID NO: 112** VH GPRC5D

QVTLKESGPVLVKPTETLT LTCTVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWAGGST
NYSALMSRLTISKDTSKSQVVL TMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRFAYWGQGT L
TVSS

40 **SEQ ID NO: 113** VL GPRC5D

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 114 VL GPRC5D

45 EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASN RATGIP
ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 115 VL GPRC5D

50 EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCKASQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYSGI
PARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQYNRYPTYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 116 GPRC5D

MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIIIESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNV
 LPTQLLFLLSVLGLFGLAFAFIILNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLV
 5 RGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVLLVYV
 LFLMALTFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITVLFSEIHWVWISMLLRGNPQFQRQPQ
 WDDPVVCIALVTNAWVFLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPVTAYQHSFQVEN
 QELSRARDSDGAEDVALTSYGTPIQPQTVDPQTQECFIPQAKLSPQQDAGGV

SEQ ID NO: 117 CD3 CDR 1

TYAMN

SEQ ID NO: 118 CD3 CDR 2

RIRSKYNNYATYYAASVKG

SEQ ID NO: 119 CD3 CDR 3

HGNFGNSYVSWFAY

SEQ ID NO: 120 VH CD3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN
 NYATYYAASVKGRTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWF
 AYWGGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 121 CD3, тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN
 NYATYYAASVKGRTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWF
 AYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
 YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
 30 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 122 CD3 CDR 1

RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO: 123 CD3 CDR 2

GTNKRAP

SEQ ID NO: 124 CD3 CDR 3

ALWYSNLWV

SEQ ID NO: 125 VL CD3

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA
 45 PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 126 CD3, легкая цепь

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA
 PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK

AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

- 5 **SEQ ID NO: 127** [линкер](#)
GGGSGGGS
- 10 **SEQ ID NO: 128** [линкер](#)
GGGSGGGS GGGS
- 15 **SEQ ID NO: 129** [линкер](#)
GGGSGGGS GGGS GGGS
- SEQ ID NO: 130** [линкер](#)
GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS
- 20 **SEQ ID NO: 131** [линкер](#)
GGGSGGGS GGGS GGGS
- SEQ ID NO: 132** [линкер](#)
GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS
- 25 **SEQ ID NO: 133** [линкер](#)
GSTSGSGKPGSGEGSTKG
- SEQ ID NO: 134** [линкер](#)
IRPRAIGGSKPRVA
- 30 **SEQ ID NO: 135** [линкер](#)
GKGGSGKGGSGKGGGS
- SEQ ID NO: 136** [линкер](#)
GGKGGSGKGGSGGKGS
- 35 **SEQ ID NO: 137** [линкер](#)
GGGKSGGGKSGGGKS
- SEQ ID NO: 138** [линкер](#)
GKGKSGKGKSGKGKS
- 40 **SEQ ID NO: 139** [линкер](#)
GGGKSGGKGGSGKGGGS
- SEQ ID NO: 140** [линкер](#)
GKPGSGKPGSGKPGS
- 45 **SEQ ID NO: 141** [линкер](#)
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS
- 50 **SEQ ID NO: 142** [линкер](#)
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS

SEQ ID NO: 143 линкер
STAGDTHLGGEDFD

5 **SEQ ID NO: 144** линкер
GEGSGEGSGEGGS

SEQ ID NO: 145 линкер
GGEGSGGEGSGGEGS

10 **SEQ ID NO: 146** линкер
GEGESGEGESGEGES

15 **SEQ ID NO: 147** линкер
GGGESGGEGSGEGGS

SEQ ID NO: 148 линкер
GEGESGEGESGEGESGEGES

20 **SEQ ID NO: 149** линкер
GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO: 150 линкер
PRGASKSGSASQTGSAPGS

25 **SEQ ID NO: 151** линкер
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

30 **SEQ ID NO: 152** линкер
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG

SEQ ID NO: 153 линкер
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

35 **SEQ ID NO: 154** линкер
GSGS

SEQ ID NO: 155 линкер
APAPAPAPAP

40 **SEQ ID NO: 156** линкер
APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

45 **SEQ ID NO: 157** линкер
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA

SEQ ID NO: 158 Ig1
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
50 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **SEQ ID NO: 159** Ig1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
10 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 160 Ig4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
15 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
20 RLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 161 эпитоп CD3
QDGNEEMGGITQTP

SEQ ID NO: 162 эпитоп BCMA
25 LLHACIPCQL

SEQ ID NO: 163 линкер
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 164 CDR BCMA
SIYYSGRTYYNPSLKS

SEQ ID NO: 165 Нуклеотидная последовательность гена тяжелой цепи 1 BGCB491 с
подчеркнутой кодирующей областью сигнального пептида.

35 ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGATTTGGACC
TGCTTGGGCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGACTCGTGCGGCCTTCC
CAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGCGACTCCGTGTTCAACAACAACG
CCGCCTGGTCCTGGATCCGGCAGTCTCCATCTCGCGGTCTGGAGTGGCTCGGTCTG
CACCTACTACCGCTCTAAATGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGG
40 ATCACCGTGAACCCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCACCCTGCAGCTGAACTCCG
TGACCCCTGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCCTCCTCCTTC
GACTATTGGGGCCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
45 TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAG
GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT
GAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCC
50 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGA

AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
 5 GTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC
 CAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACA
 10 AGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCGGTTACGCAGAAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAAGGAGGCGGA
 GGATCTGGCGGAGGTGGAAGTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGTGGATCTGAC
 ATCGTGATGACCCAGACACCTCTGAGCAGCCCCGTTACATTGGGCCAGCCTGCCT
 CCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCCCTGGTGCCTCTGACGGCAACACCTACCTC
 TCTTGGCTGCAGCAGAGGCCTGGACAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGATCT
 15 CCAACCGGTTCTTCGGCGTGCCCGACAGATTTTCTGGATCTGGCGCTGGCACCGA
 CTTACCCCTGAAGATTTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGT
 ATGCAGGCCACACAGTTCCCTCACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
 AGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCG
 GCGGAAGCCAAGTGACCCTGAAAGAAAGCGGCCCTGTGCTGGTCAAGCCCACCG
 20 AAACACTGACCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATATCCGGAT
 GTCCGTGTCCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTGGCCAC
 ATCTTCTCCAACGACGAGAAGTCTTACTCCACCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCA
 TCTCCAGAGACACCTCCAAGTCTCAGGTGGTGTGCTGACACTGACCAACGTGGACCC
 TGTGGATAACCGCCACCTACTACTGCGCCAGAATGAGACTGCCCTACGGCATGGAT
 25 GTGTGGGGCCAGGGAACAACCGTGACCGTTTCTTCT

SEQ ID NO: 166 Нуклеотидная последовательность гена легкой цепи BGCB491 с подчеркнутой кодирующей областью сигнального пептида.

30 ATGGCTAGATCCGCACTGCTCATTCTGGCTCTGCTTCTGCTTGGACTGTTCTCTCC
TGGAGCATGGGGACAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCC
 GGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACA
 AGTTCGTGTCTGGTATCAGCAACACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTA
 CGAGGTGTCCAAGCGGCCCTCTGGCGTGTCTCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCT
 35 GGCAACACCGCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGAC
 TACCACTGTGTGTCTACGCTGGCTCTGGCACCCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCA
 AGCTGACTGTCCTGGGTGACCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCC
 CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGAC
 TTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAG
 40 GCGGGAGTCGAAACCACCAACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
 AGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC
 TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGAGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAA
 TGTTCA

45 **SEQ ID NO: 167** Нуклеотидная последовательность гена тяжелой цепи 2 BGCB491 с подчеркнутой кодирующей областью сигнального пептида.

50 ATGGCCAGGAAGTCCGCTCTGCTCGCTCTGGCACTTCTGCTTCTGGGATTTGGACC
TGCTTGGGCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAG
 GCGAGAGAGCTACCCTGTCTGTAGAGCCAGCCAGTCTATCTCCTCCTCCTTCCTG

ACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCTCGGCTGTTGATCTACGGTGCTT
CTTCCAGAGCCACAGGCATCCCTGACAGATTCTCTGGCGGCGGATCTGGCACCGA
CTTCAACCCTGACAATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC
CAGCACTACGGCAGCAGCCCCATGTACACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAA
5 ATCAAGGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCC
ACCGGCGGAAGCGAGGTTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCT
GGCGGTTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGC
TATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATC
TCTGGCTCTGGCGGCAGCACCTACTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCA
10 TCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGC
CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAAGGACGAGGGCTACTCCTCCGGCCAC
TACTACGGAATGGATGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACAGTCTTCTTGAGC
CCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGC
CGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
15 TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTGGAACA
AAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
20 GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
AGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGA
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
25 ACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Триспецифическое антитело или его триспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:
 - 5 (а) первое антигенсвязывающее плечо, содержащее первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1);
 - (b) второе антигенсвязывающее плечо, содержащее второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2);
 - 10 (с) третье антигенсвязывающее плечо, содержащее третий переменный домен тяжелой цепи (VH3) и третий переменный домен легкой цепи (VL3),
 причем первое антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), а третье антигенсвязывающее плечо связывается

15 с эпитопом на антигене созревания В-клеток (BCMA).

2. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 1, в котором VH1 и VL1 первого антигенсвязывающего плеча присутствуют в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело),

20 необязательно Fab.

3. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 1 или 2, в котором VH2 и VL2 второго антигенсвязывающего плеча

25 присутствуют в диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело), необязательно scFv.

4. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по

30 любому из пп. 1–3, в котором VH3 и VL3 третьего антигенсвязывающего плеча присутствуют в фрагменте антитела, диателе, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, дисульфидном стабилизированном Fv-фрагменте (dsFv) или дисульфидном стабилизированном диателе (ds-диатело), необязательно scFv.

5. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 варибельного домена тяжелой цепи (VH1) SEQ ID NO: 8 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи (VL1) SEQ ID NO: 7.
6. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–5, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность GYSSSFYD (SEQ ID NO: 6); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность EVSKRPS (SEQ ID NO: 2), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3).
7. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит VH1 SEQ ID NO: 8 и VL1 с SEQ ID NO: 7.
8. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–7, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 варибельного домена тяжелой цепи (VH2) SEQ ID NO: 16 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи (VL2) SEQ ID NO: 15.
9. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–8, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную

- последовательность GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность
- 5 RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность KISNRFF (SEQ ID NO: 10), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11).
10. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–9, в котором второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит VH2 SEQ ID NO: 16 и VL2 с SEQ ID NO: 15.
11. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по 15 любому из пп. 1–10, в котором третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 варибельного домена тяжелой цепи (VH3) SEQ ID NO: 24 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи (VL3) SEQ ID
- 20 NO: 23.
12. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–11, в котором третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, содержащую аминокислотную
- 25 последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22); и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность
- 30 RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).
13. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–12, в котором третье антигенсвязывающее плечо,

которое связывает BCMA, содержит VH3 SEQ ID NO: 24 и VL3 с SEQ ID NO: 23.

14. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH1 SEQ ID NO: 8 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL1 SEQ ID NO: 7;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH2 SEQ ID NO: 16 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL2 SEQ ID NO: 15; и

третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH3 SEQ ID NO: 24 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL3 SEQ ID NO: 23.

15. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4 и 14, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, 5, 6, 1, 2, 3 соответственно;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 12, 13, 14, 9, 10 и 11 соответственно; и

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 20, 21, 22, 17, 18 и 19 соответственно.

16. Триспецифическое антитело или триспецифический антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–4, 14 и 15, в котором первое антигенсвязывающее плечо, которое связывает CD3, содержит VH1 SEQ ID NO: 8 и VL1 с SEQ ID NO: 7;

второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает GPRC5D, содержит VH2 SEQ ID NO: 16 и VL2 с SEQ ID NO: 15; и

третье антигенсвязывающее плечо, которое связывает BCMA, содержит VH3 SEQ ID NO: 24 и VL3 с SEQ ID NO: 23.

17. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–16, в котором первое антигенсвязывающее плечо содержит домен кристаллизующегося фрагмента (Fc) и второе антигенсвязывающее плечо или третье антигенсвязывающее плечо содержит домен Fc.
- 5
18. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент по п. 17, в котором домены Fc содержат одну или более мутаций, которые способствуют гетеродимеризации доменов Fc.
- 10
19. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 18, в котором мутации выбраны из T366S, L368A, T366W и Y407V (нумерация ЕС).
- 15
20. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 17–19, в котором домены Fc дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с Fcγ-рецептором.
- 20
21. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 20, в котором Fcγ-рецептор представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA и/или FcγRIIIB.
- 25
22. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 20 или 21, в котором домены Fc содержат одну или более мутаций, выбранных из L234A, L235A и D265S (нумерация ЕС).
- 30
23. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 17–22, в котором домены Fc дополнительно содержат одну или более мутаций, которые снижают связывание Fc с белком A.
24. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 23, в котором домен Fc содержит мутации H435R и/или Y436F (нумерация ЕС).

25. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–24, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с остатками 22–35 (QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161) цепи CD3ε.
- 5 26. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–25, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 1×10^{-8} до 1×10^{-7} М.
- 10 27. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 26, в котором первое антигенсвязывающее плечо специфически связывается с CD3 с аффинностью от около 2×10^{-8} до 4×10^{-8} М.
- 15 28. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–27, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)) цепи ВСМА ВСМW37.
- 20 29. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–28, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 1×10^{-10} до 1×10^{-7} М.
- 25 30. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 29, в котором третье антигенсвязывающее плечо специфически связывается с ВСМА с аффинностью от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М.
- 30 31. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), и третье антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на антигене созревания В-клеток (ВСМА),

причем первое антигенсвязывающее плечо содержит полипептид тяжелой цепи (HC1) и полипептид легкой цепи (LC); и

при этом триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент содержит один полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо.

- 5
32. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 31, в котором HC1 первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.
- 10
33. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 32 или 33, в котором LC первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.
- 15
34. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 31–33, в котором полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.
- 20
35. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 31, в котором первое антигенсвязывающее плечо содержит HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и полипептид, содержащий второе антигенсвязывающее плечо и третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.
- 25
36. Триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на кластере дифференцировки 3 (CD3), второе антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на члене D группы 5 семейства C сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR5D), и третье антигенсвязывающее плечо, которое связывается с эпитопом на антигене созревания В-клеток (BCMA),
- 30

причем первое антигенсвязывающее плечо содержит полипептид тяжелой цепи (HC1) и полипептид легкой цепи (LC), при этом полипептид тяжелой цепи (HC1) дополнительно содержит второе антигенсвязывающее плечо,

5 при этом триспецифическое антитело или его триспецифический связывающий фрагмент дополнительно содержит один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо.

10 37. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 36, в котором HC1 первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

15 38. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 36 или 37, в котором LC первого антигенсвязывающего плеча содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

20 39. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 36–38, в котором один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

25 40. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по п. 36, в котором первое антигенсвязывающее плечо содержит HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и один полипептид, содержащий третье антигенсвязывающее плечо, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

30 41. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–40, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет (человеческий) изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

42. Триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–41, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет (человеческий) изотип IgG1.
- 5 43. Синтетический полинуклеотид, кодирующий триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–42.
44. Фармацевтическая композиция, содержащая триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–42 и
10 фармацевтически приемлемый носитель.
45. Фармацевтическая композиция по п. 44, которая дополнительно содержит второй терапевтический агент.
- 15 46. Фармацевтическая композиция по п. 45, в которой второй терапевтический агент содержит агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.
- 20 47. Клетка, экспрессирующая триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–42.
48. Клетка по п. 47, которая представляет собой гибридому.
- 25 49. Клетка по п. 47 или 48, в которой триспецифическое антитело получено рекомбинантным способом.
50. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение
30 субъекту терапевтически эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пп. 1–42 или фармацевтической композиции по любому из пп. 44–46.

51. Способ по п. 50, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.
- 5 52. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем указанный способ включает введение в указанную клетку эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пп. 1–42 или фармацевтической композиции по
10 любому из пп. 44–46, при этом указанное эффективное количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.
53. Способ по п. 52, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят триспецифическое антитело или триспецифический
15 связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.
54. Способ по п. 52, в котором указанное введение выполняют *ex vivo*.
55. Способ перенаправления Т-клетки на раковые клетки, экспрессирующие ВСМА и/или GPRC5D, у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ
20 включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пп. 1–42 или фармацевтической композиции по любому из пп. 44–46.
- 25 56. Способ по п. 55, в котором указанное терапевтически эффективное количество является достаточным для направления указанного Т-клеточного ответа на указанные раковые клетки.
- 30 57. Способ по любому из пп. 50–56, в котором рак представляет собой гемобластоз.
58. Способ по п. 57, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D.

59. Способ по п. 58, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D представляет собой множественную миелому.
- 5 60. Способ по п. 58 или 59, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА и/или GPRC5D представляет собой тлеющую множественную миелому (SMM).
61. Способ любому из пп. 50–60, в котором рак представляет собой рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак или любую их комбинацию.
- 10 62. Способ по любому из пп. 50–51, 53 и 55–61, в котором субъект получал предшествующую терапию.
63. Способ по п. 62, в котором предшествующая терапия включает в себя ингибитор протеасом, иммуномодулирующее лекарственное средство, антитело к CD38, биспецифический агент, CAR-T-терапию или любую их комбинацию.
- 15 64. Способ по любому из пп. 50–63, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.
- 20 65. Способ по п. 64, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или средство для нацеленной противораковой терапии.
- 25 66. Способ по п. 65, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).
- 30 67. Способ по п. 64, в котором второй терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.

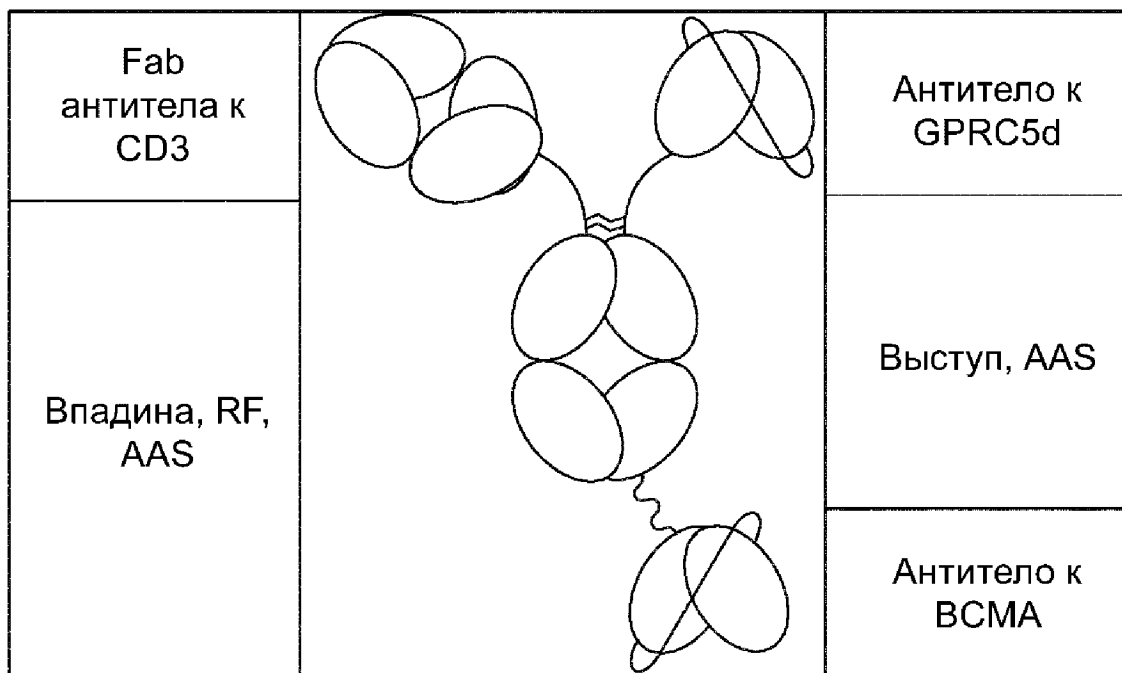
68. Способ по любому из пп. 50–51, 53 и 55–67, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно и/или подкожно.
- 5
69. Способ по любому из пп. 50–51, 53 и 55–68, в котором триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно.
- 10
70. Способ получения триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента по любому из пп. 1–42, в котором указанный способ включает культивирование клетки по любому из пп. 47–49 и выделение указанного триспецифического антитела или триспецифического связывающего фрагмента.
- 15
71. Набор, содержащий (i) триспецифическое антитело или триспецифический связывающий фрагмент по любому из пп. 1–42 и/или полинуклеотид по п. 43 и (ii) упаковку для него.
- 20
72. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ВСМА, содержащее: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20), CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21), и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22).
- 25
73. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 72, дополнительно содержащее: определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1), имеющую аминокислотную последовательность RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17), CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 18), и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19).
- 30

74. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 72 или 73, содержащее
вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 24.
- 5 75. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–74,
содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 23.
- 10 76. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–75, которые
специфически связываются с остатками 17–26 (LLHACIPCQL (SEQ ID NO:
162)) цепи ВСМА ВСМW37.
- 15 77. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–76, которые
специфически связываются с ВСМА с аффинностью от около 1×10^{-10} до 1×10^{-7} М.
78. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 77, которые специфически
связываются с ВСМА с аффинностью от около 2×10^{-10} до 9×10^{-10} М.
- 20 79. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–78, которые
представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.
80. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–79, которые
являются рекомбинантными.
- 25 81. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–80, который представляет
собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.
82. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–81, которые
представляют собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- 30 83. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–82, которые
представляют собой изотип IgG1 или IgG4.

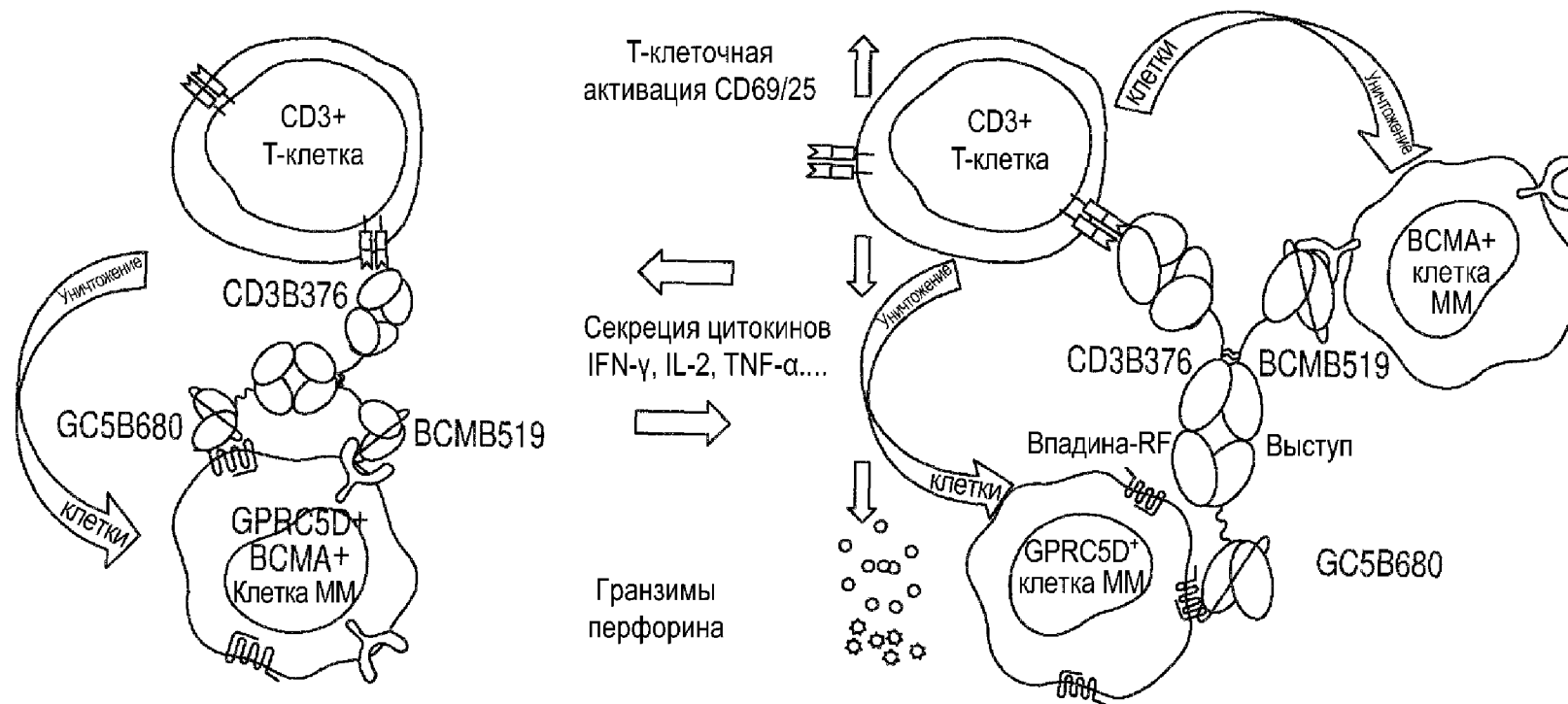
84. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–83 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 5 85. Фармацевтическая композиция по п. 84, которая дополнительно содержит второй терапевтический агент.
- 10 86. Фармацевтическая композиция по п. 85, в которой второй терапевтический агент содержит агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.
- 15 87. Клетка, экспрессирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–83.
88. Клетка по п. 87, которая представляет собой гибридому.
89. Клетка по п. 87, в которой антитело получено рекомбинантным способом.
- 20 90. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 72–83 или фармацевтической композиции по любому из пп. 84–86.
- 25 91. Способ по п. 90, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят в течение времени, достаточного для лечения рака.
- 30 92. Способ ингибирования роста или пролиферации раковой клетки, причем указанный способ включает введение в указанную клетку эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 72–83 или фармацевтической композиции по любому из пп. 84–86, при этом указанное эффективное количество является достаточным для ингибирования роста или пролиферации указанной раковой клетки.

93. Способ по п. 92, в котором указанная раковая клетка находится у субъекта, и субъекту вводят антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию.
- 5
94. Способ по п. 92, в котором указанное введение выполняют *ex vivo*.
95. Способ по любому из пп. 90–94, в котором рак представляет собой гемобластоз.
- 10
96. Способ по п. 95, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией ВСМА.
97. Способ по п. 96, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА представляет собой множественную миелому.
- 15
98. Способ по п. 97, в котором В-клеточный рак с экспрессией ВСМА представляет собой тлеющую множественную миелому (SMM).
99. Способ любому из пп. 90–98, в котором рак представляет собой рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак или любую их комбинацию.
- 20
100. Способ по любому из пп. 90–91, 93 и 95–99, в котором субъект получал предшествующую терапию.
- 25
101. Способ по п. 100, в котором предшествующая терапия включает в себя ингибитор протеасом, иммуномодулирующее лекарственное средство, антитело к CD38, биспецифический агент, CAR-T-терапию или любую их комбинацию.
- 30
102. Способ по любому из пп. 90–101, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента.

103. Способ по п. 102, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.
- 5 104. Способ по п. 103, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2 (IL-2).
- 10 105. Способ по п. 102, в котором второй терапевтический агент представляет собой агент анти-CD38, иммуномодулирующее лекарственное средство на основе имида (IMiD), ингибитор иммунных контрольных точек, иммунный костимулирующий агент, ингибитор гамма-секретазы, Т-клеточный энхансер или любую их комбинацию.
- 15 106. Способ по любому из пп. 90–91, 93 и 95–105, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно, внутримышечно, внутривнутрино и/или подкожно.
- 20 107. Способ по любому из пп. 90–91, 93 и 95–106, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно.
- 25 108. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 72–83, в котором указанный способ включает культивирование клетки по любому из пп. 87–89 и выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.
- 30 109. Синтетический полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–83.
110. Набор, содержащий (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 72–83 и/или полинуклеотид по п. 109 и (ii) упаковку для него.

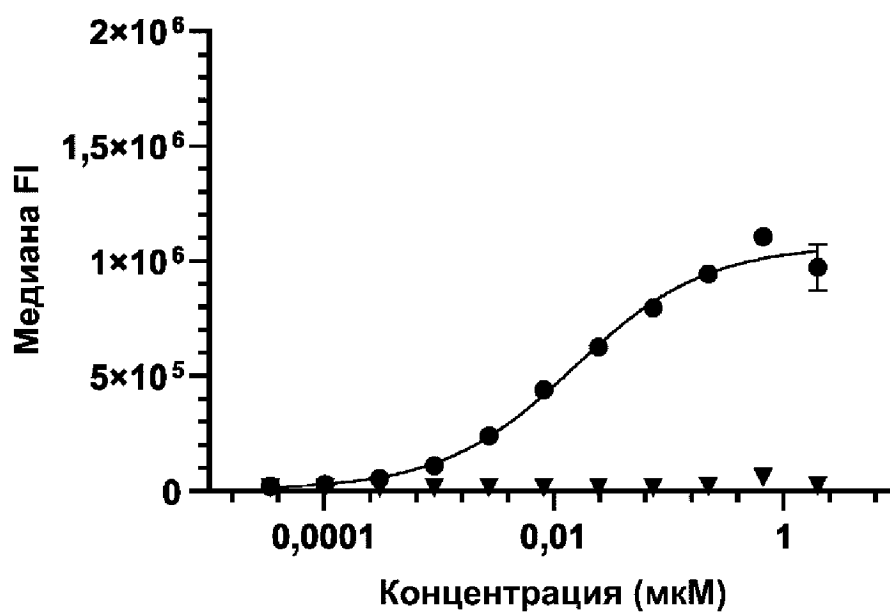
ФИГ. 1А

ФИГ. 1Б

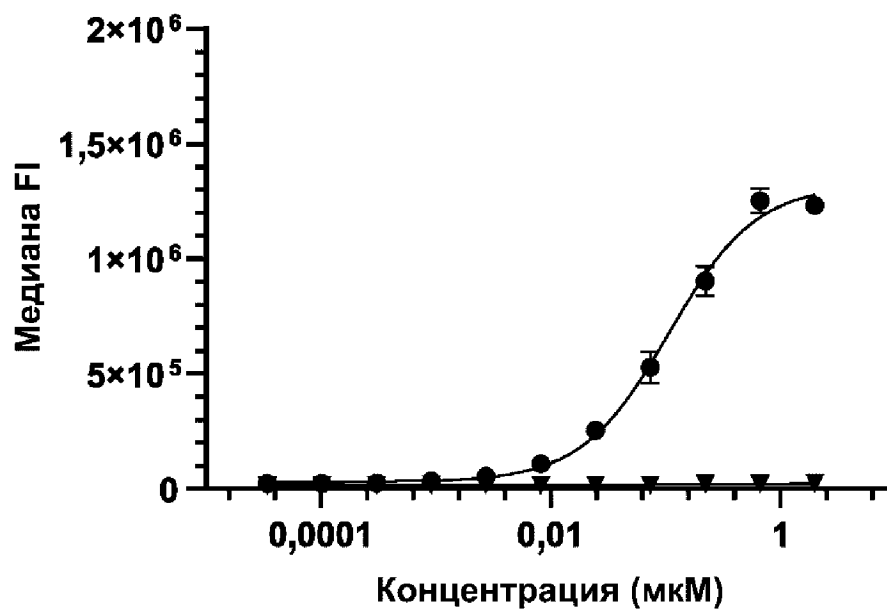


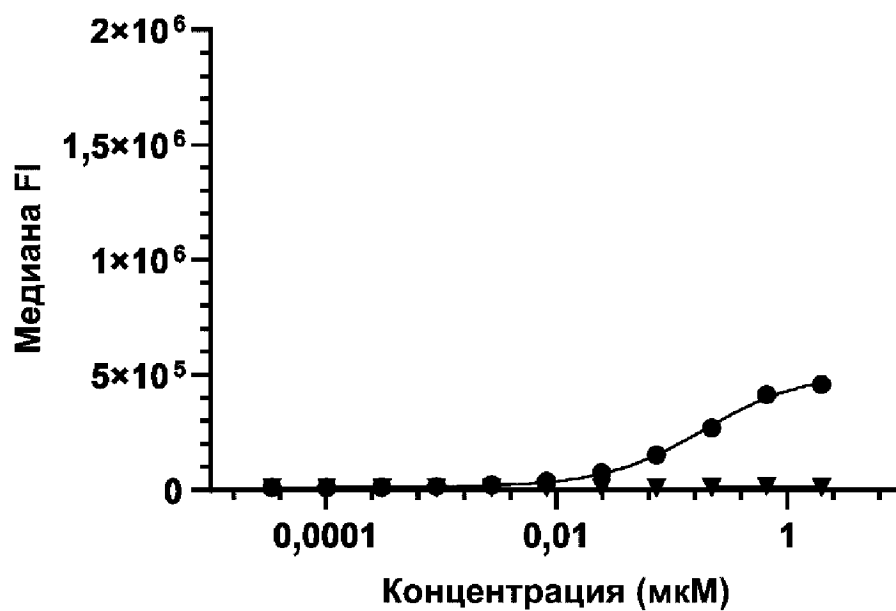
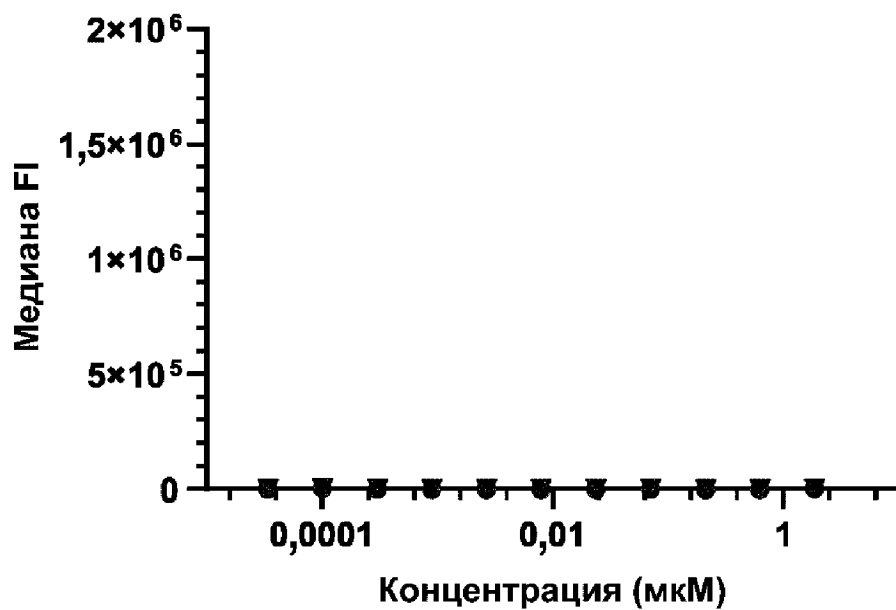
ФИГ. 2А

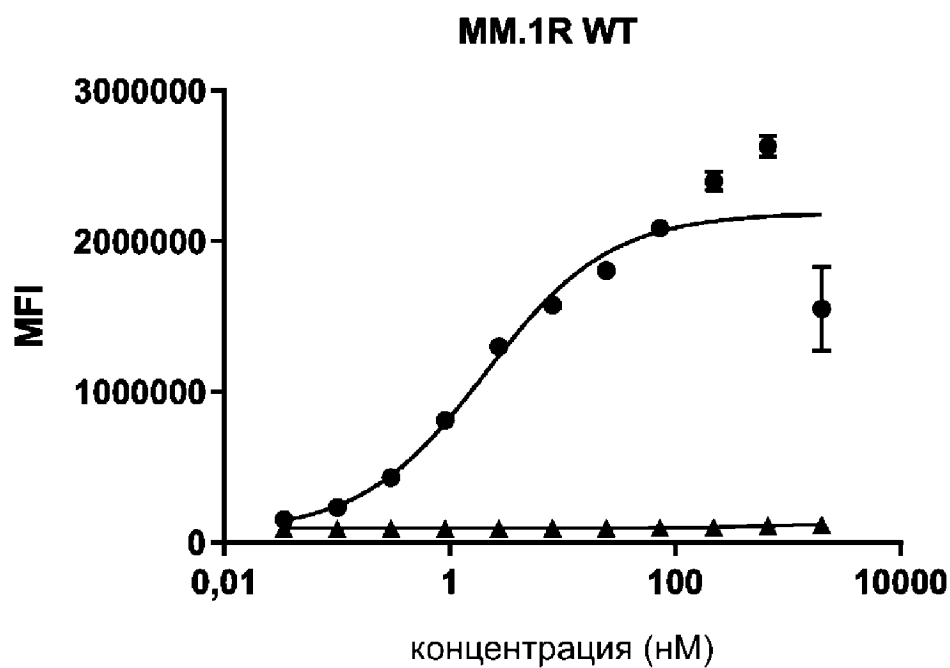
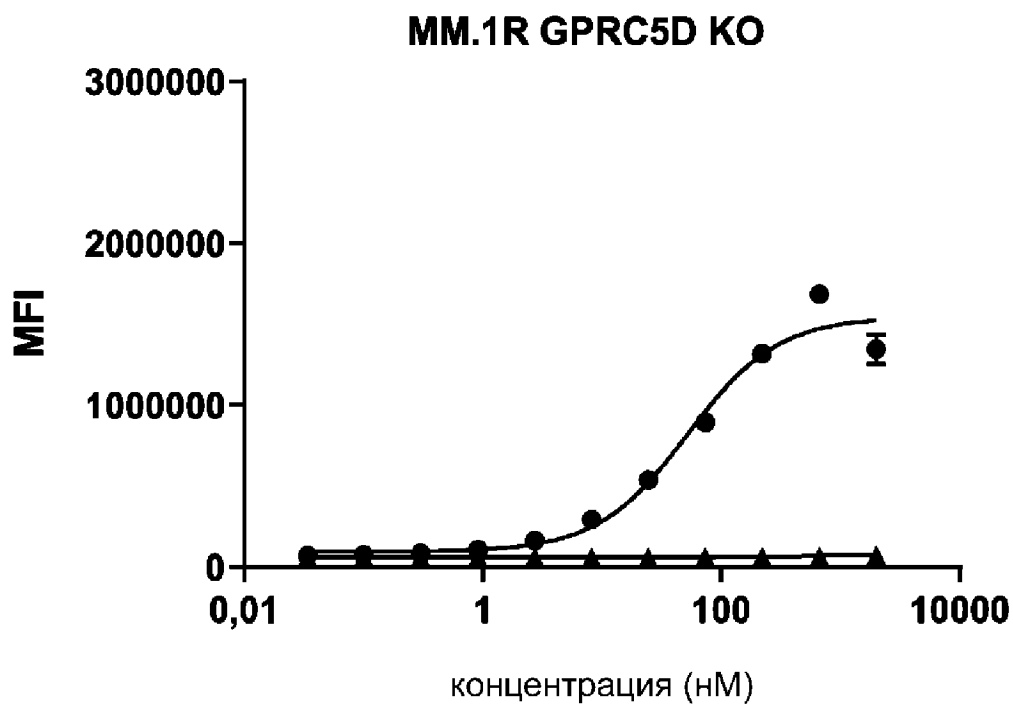
H929 дикого типа

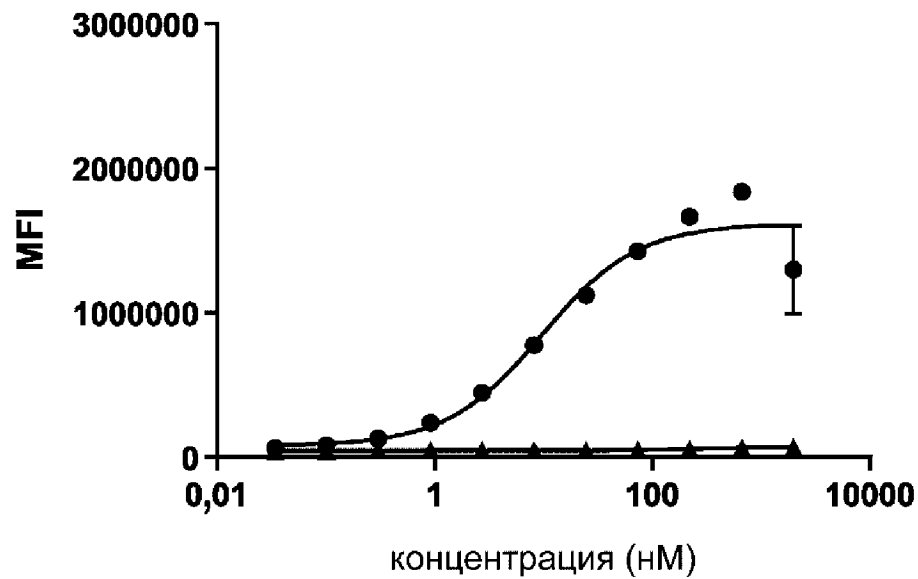
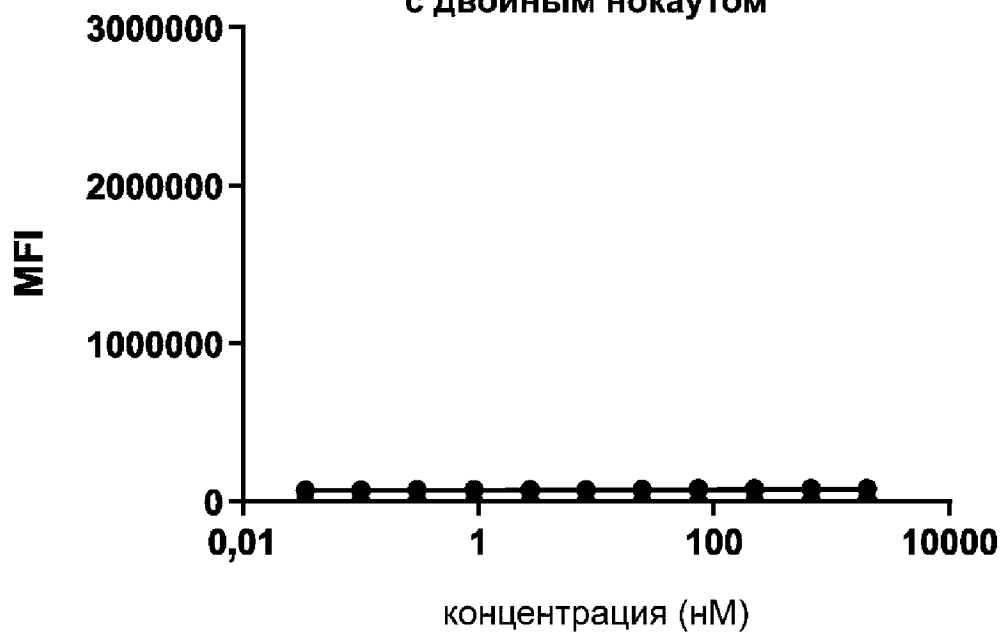
**ФИГ. 2Б**

H929 GPRC5D KO



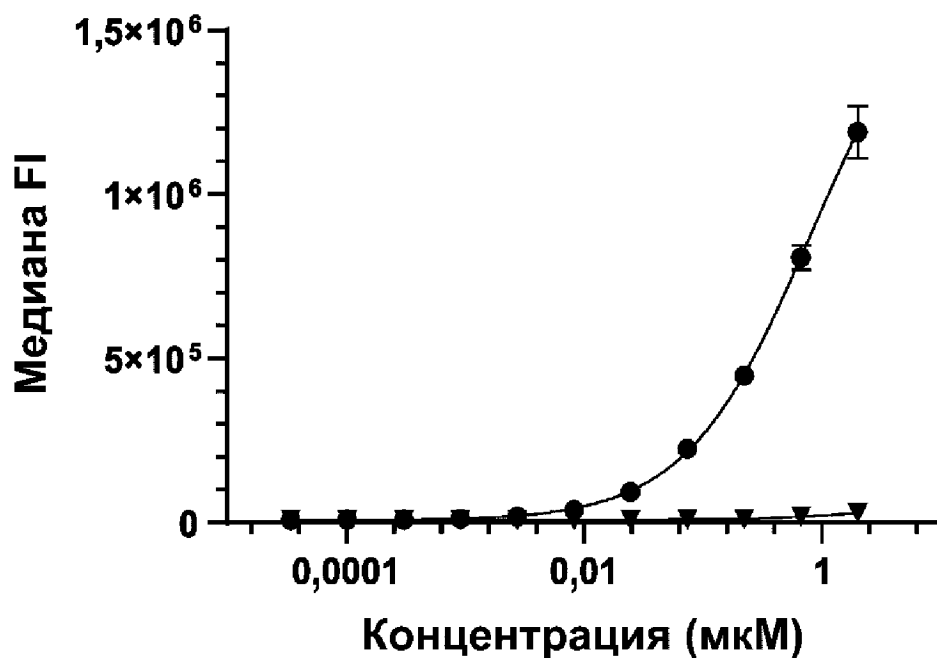
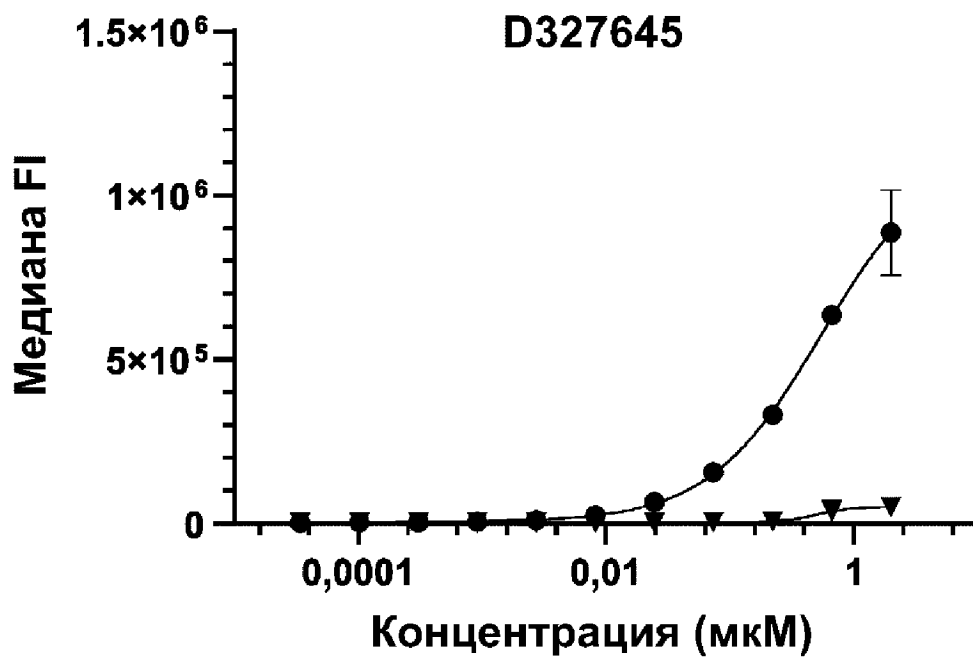
ФИГ. 2В**H929 BCMA KO****ФИГ. 2Г****H929 GPRC5D/BCMA-KO**

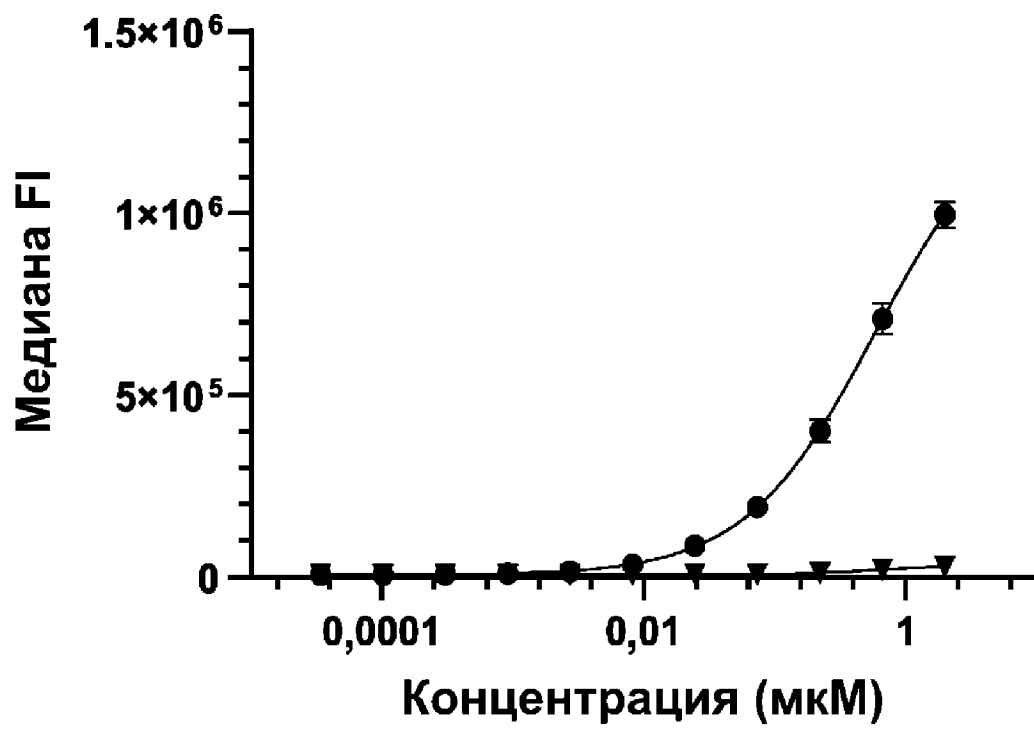
ФИГ. 3А**ФИГ. 3Б**

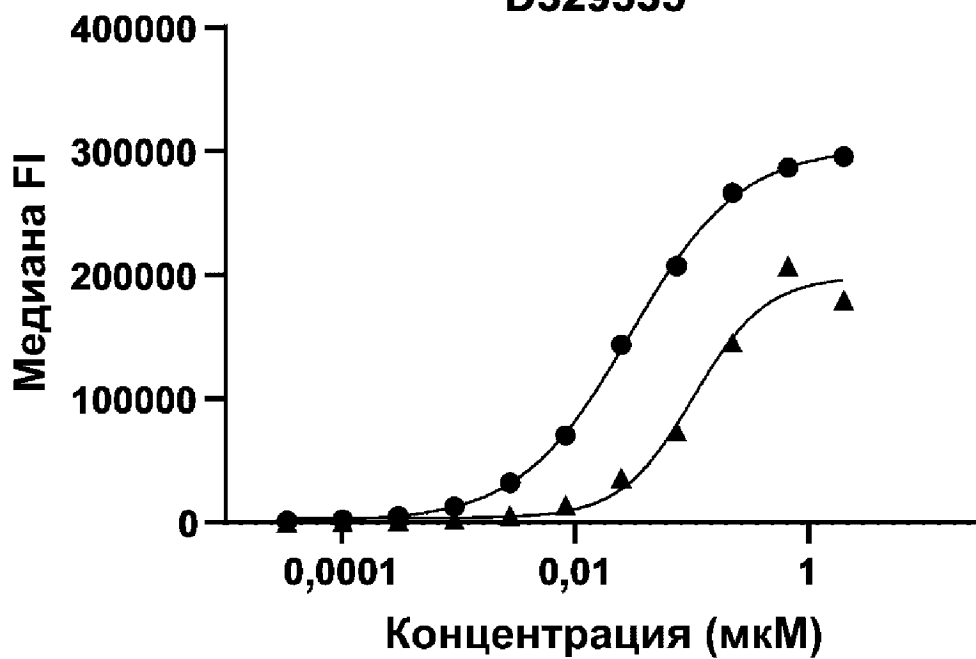
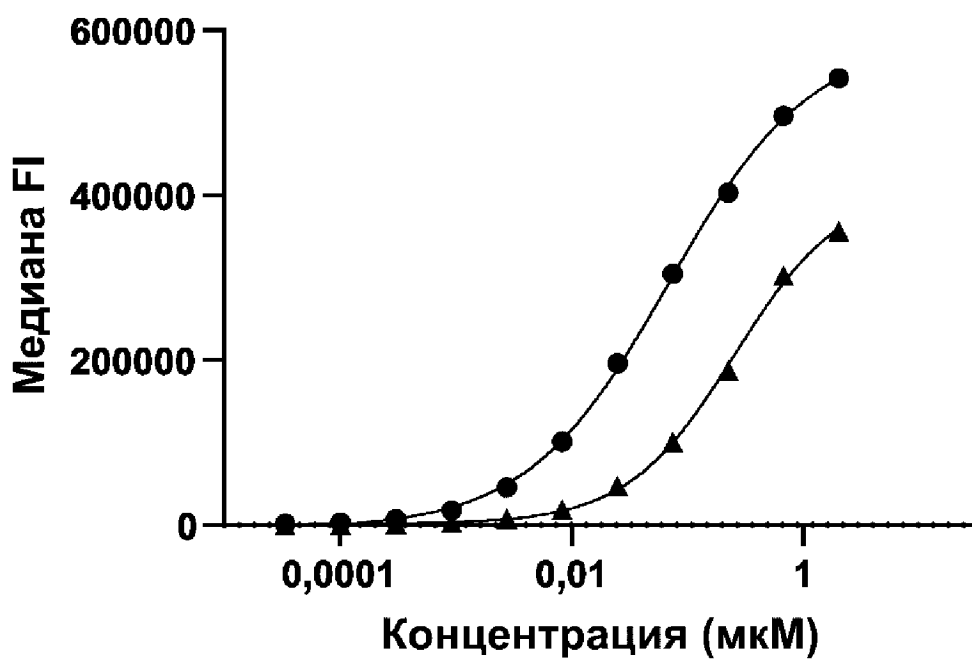
ФИГ. 3В**MM.1R BCMA KO****ФИГ. 3Г****MM.1R BCMA/GPRC5D
с двойным нокаутом**

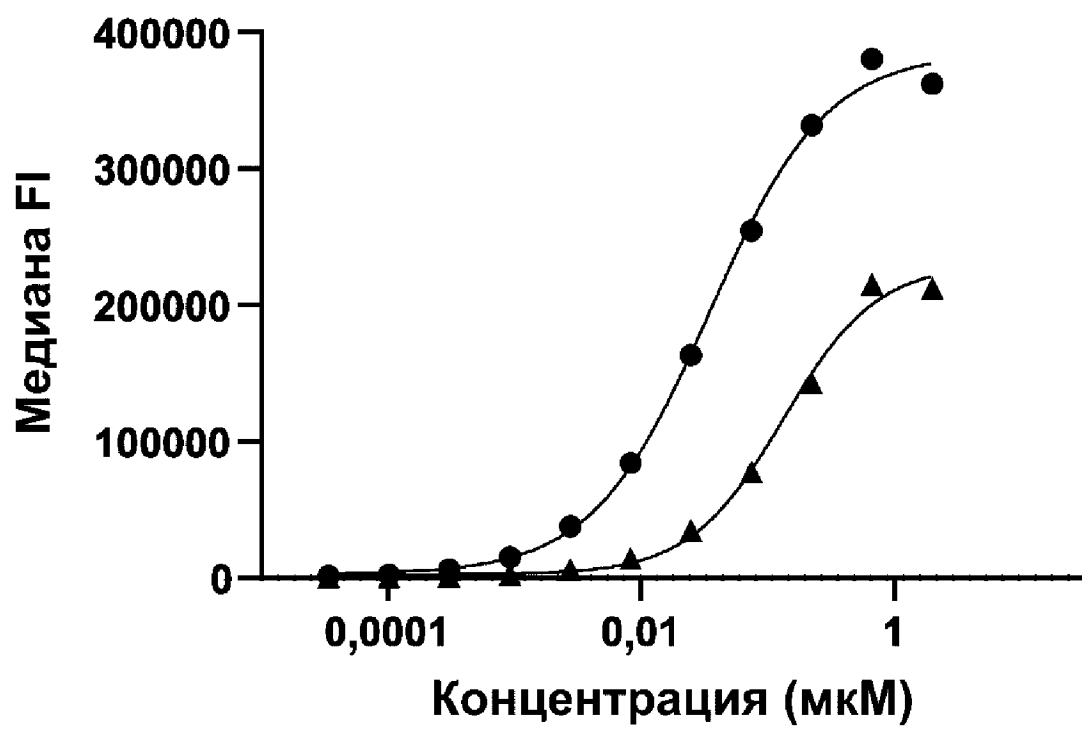
ФИГ. 4А

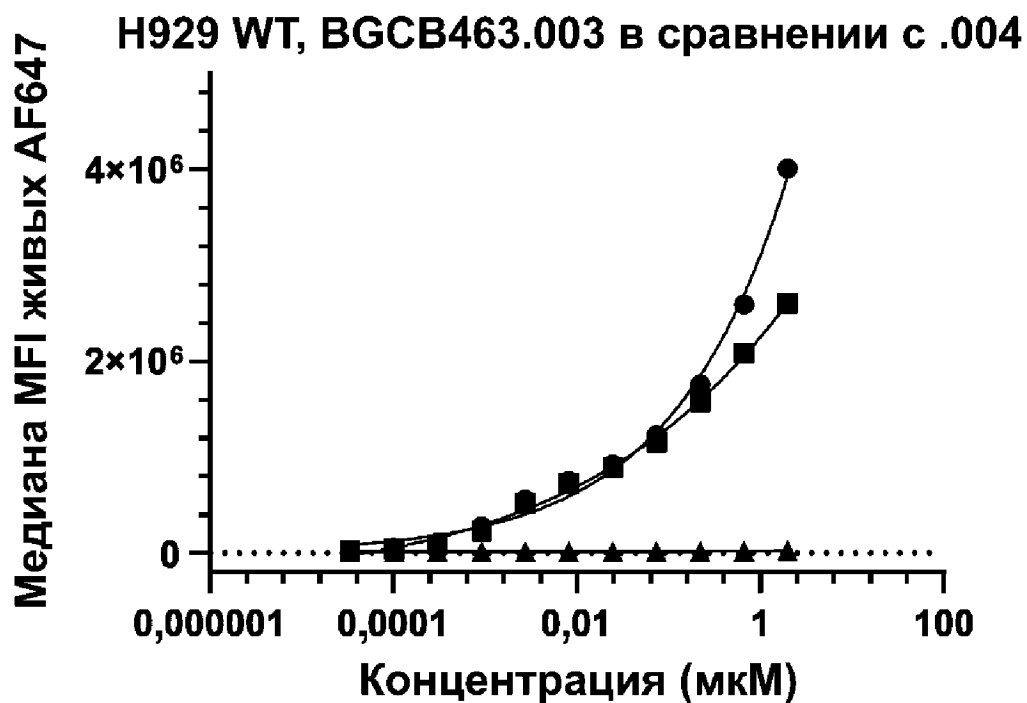
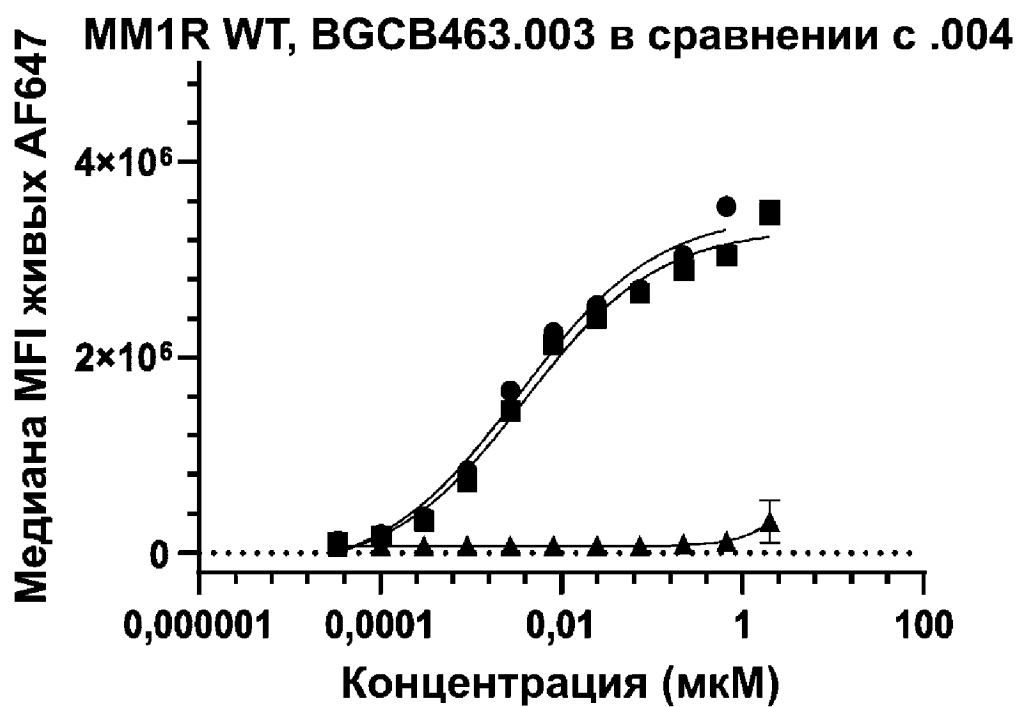
пан-Т-клетки человека D329335

**ФИГ. 4Б**пан-Т-клетки человека
D327645

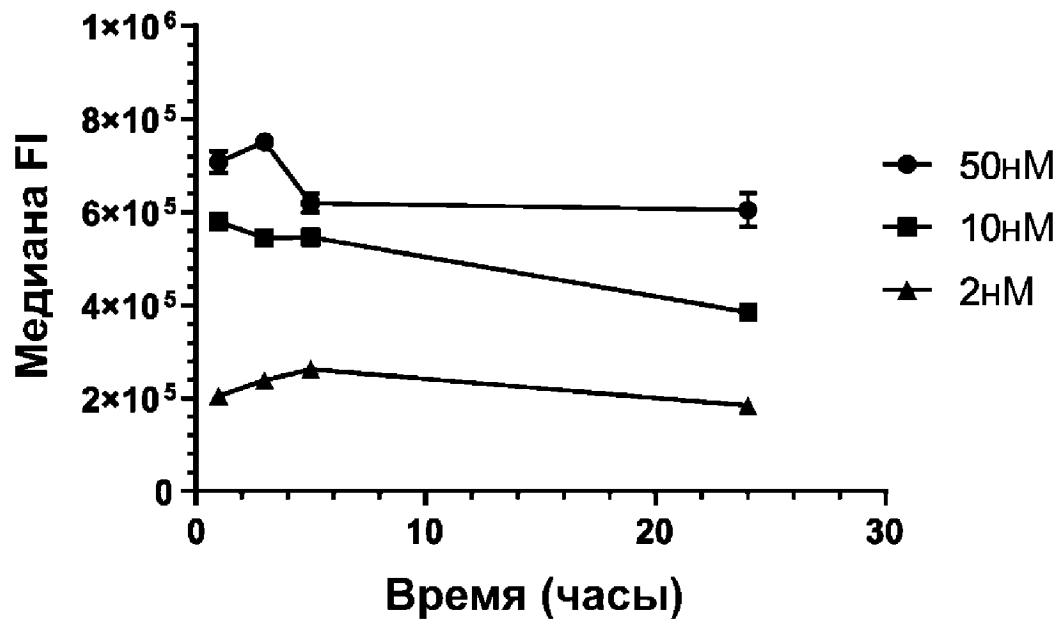
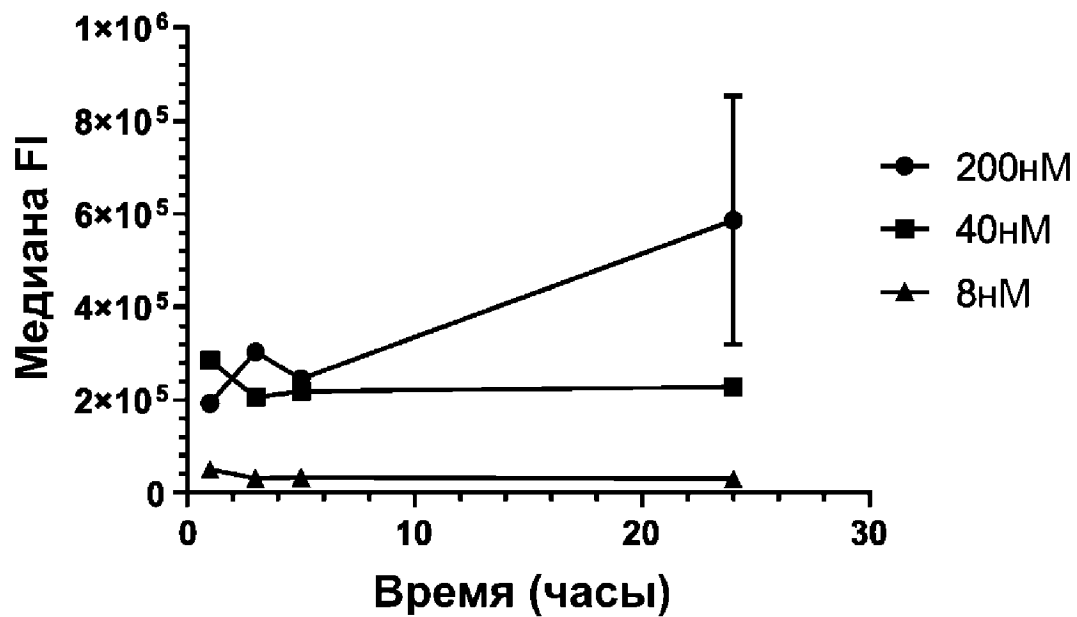
ФИГ. 4В**пан-Т-клетки человека D326589**

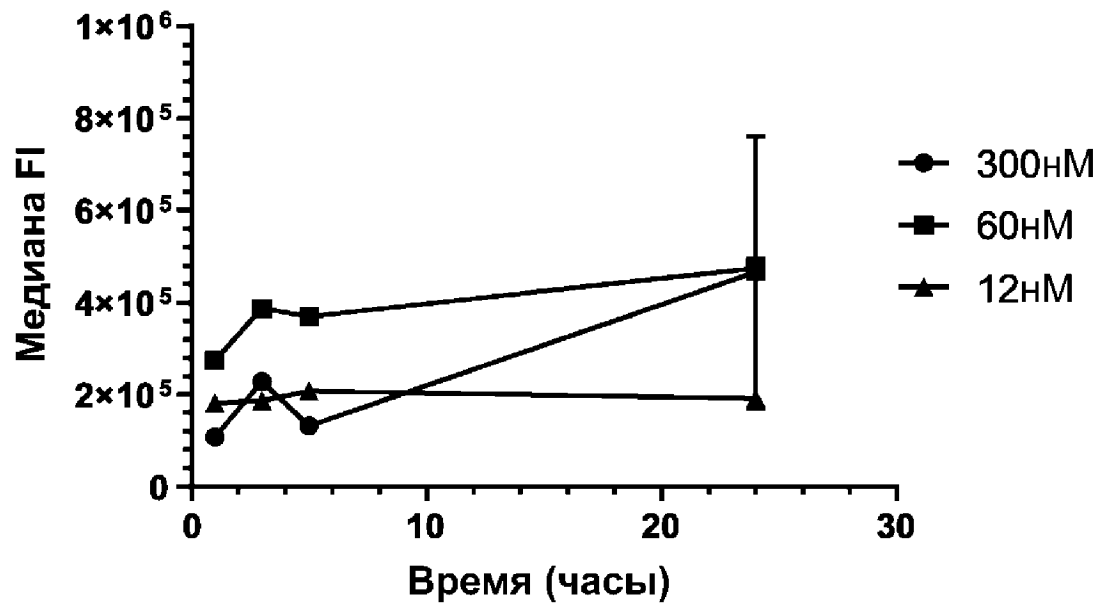
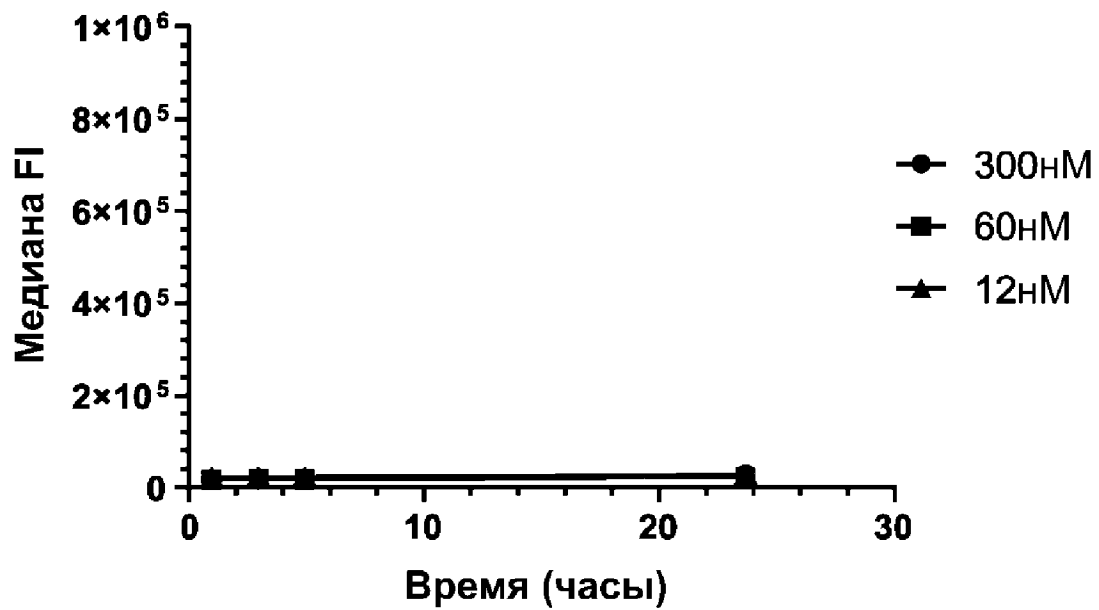
ФИГ. 5А**D329335****ФИГ. 5Б****D327645**

ФИГ. 5В**D326589**

ФИГ. 6А**ФИГ. 6Б**

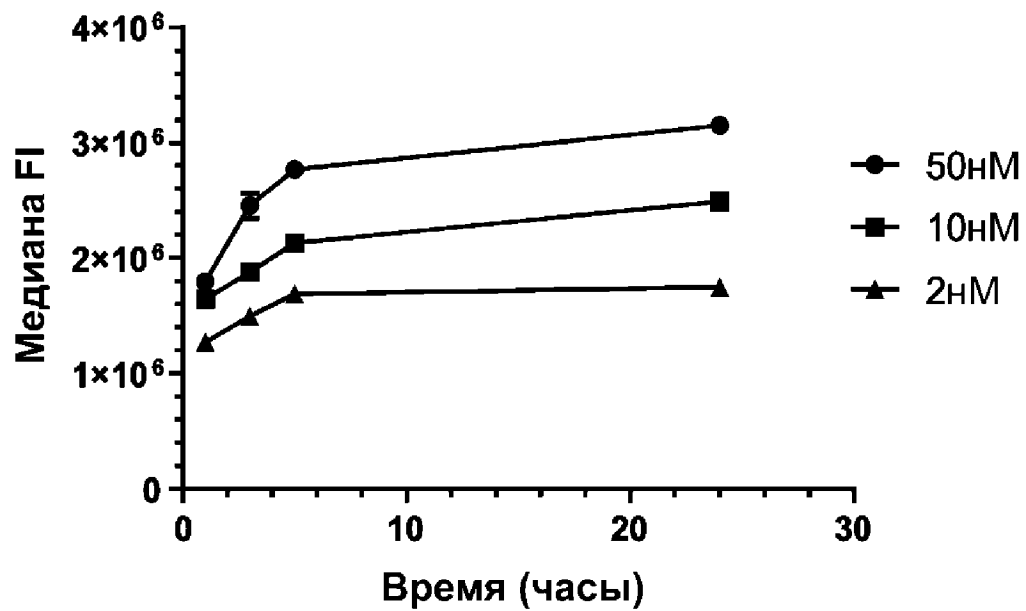
ФИГ. 6В

ФИГ. 7А**Н929 дикого типа****ФИГ. 7Б****Н929 GPRC5D-KO**

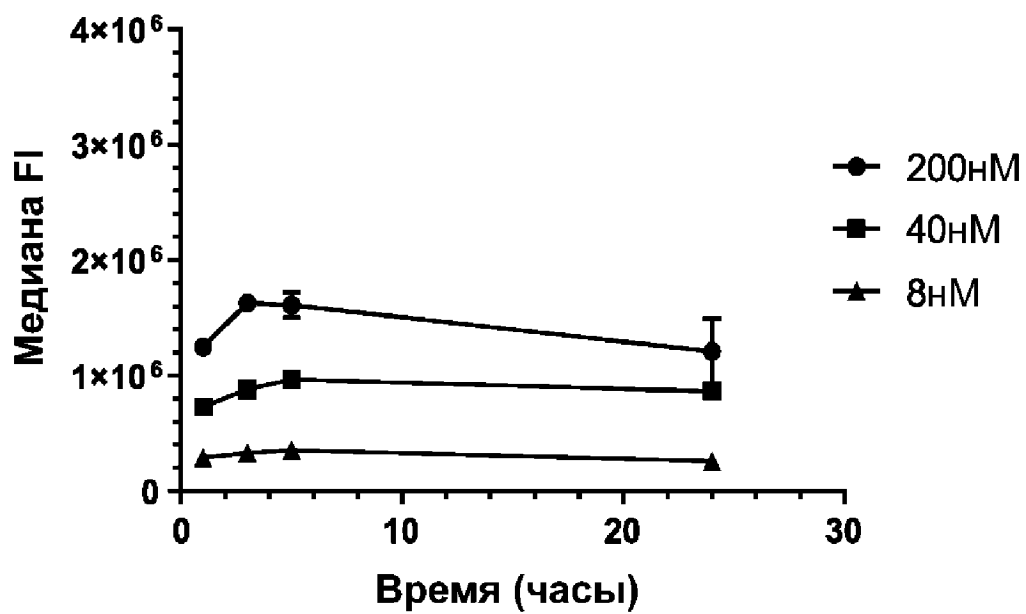
ФИГ. 7В**H929 BCMA-KO****ФИГ. 7Г****H929 GPRC5D/BCMA-KO**

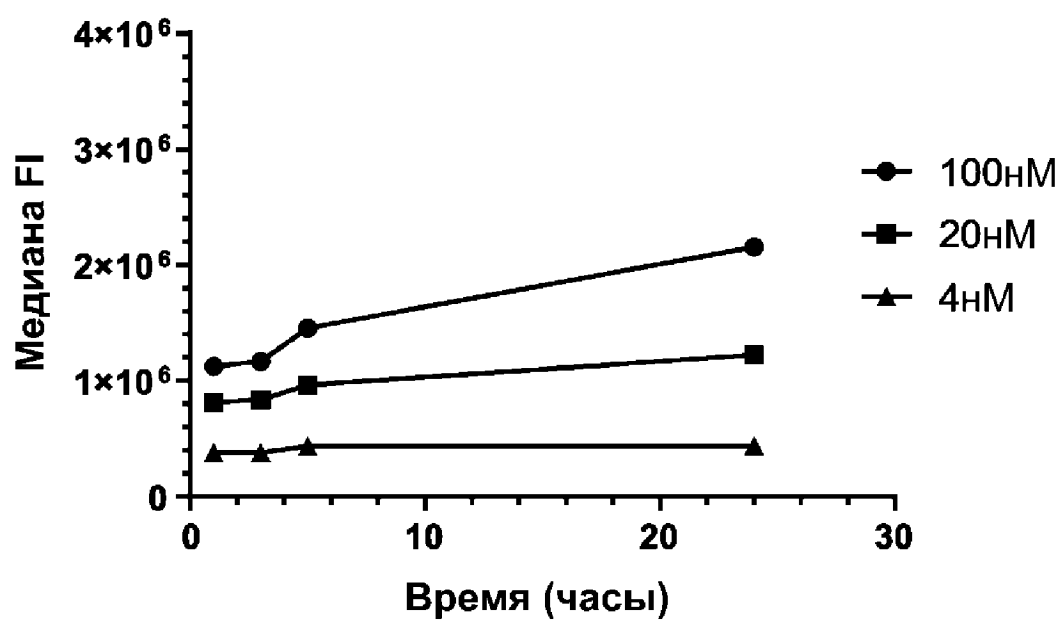
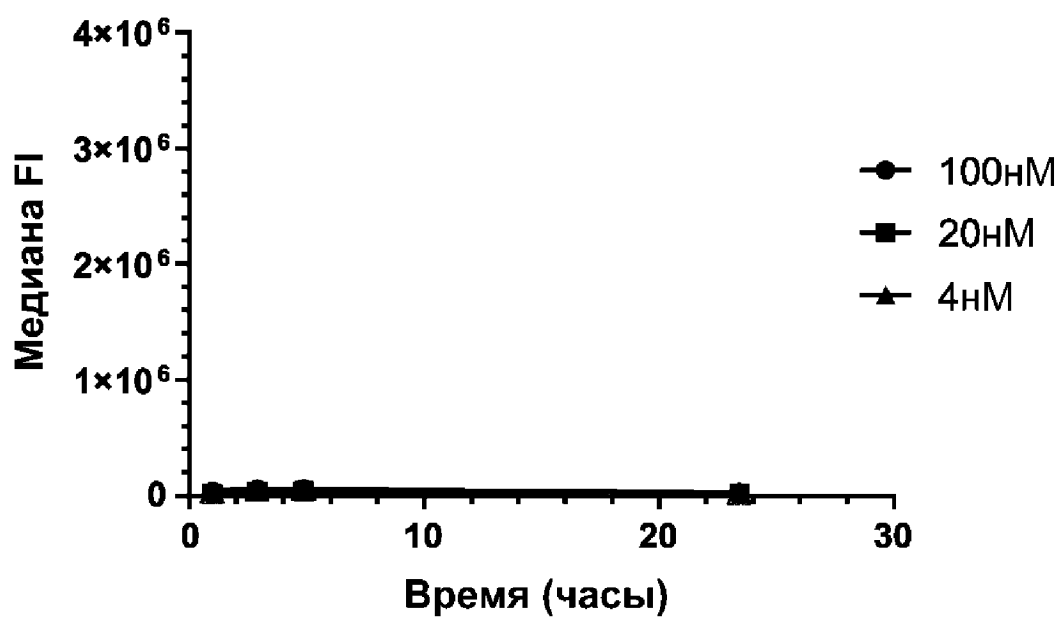
ФИГ. 8А

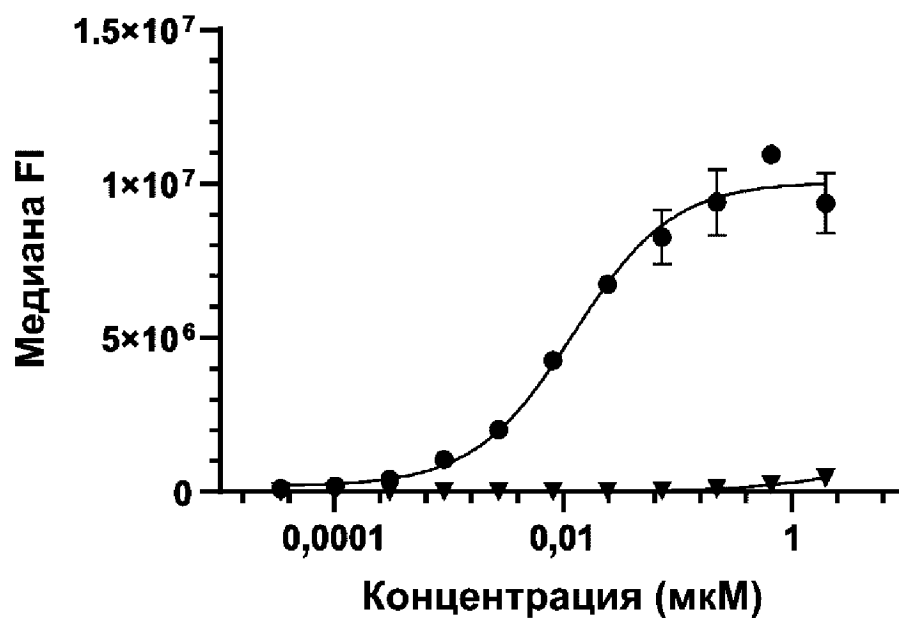
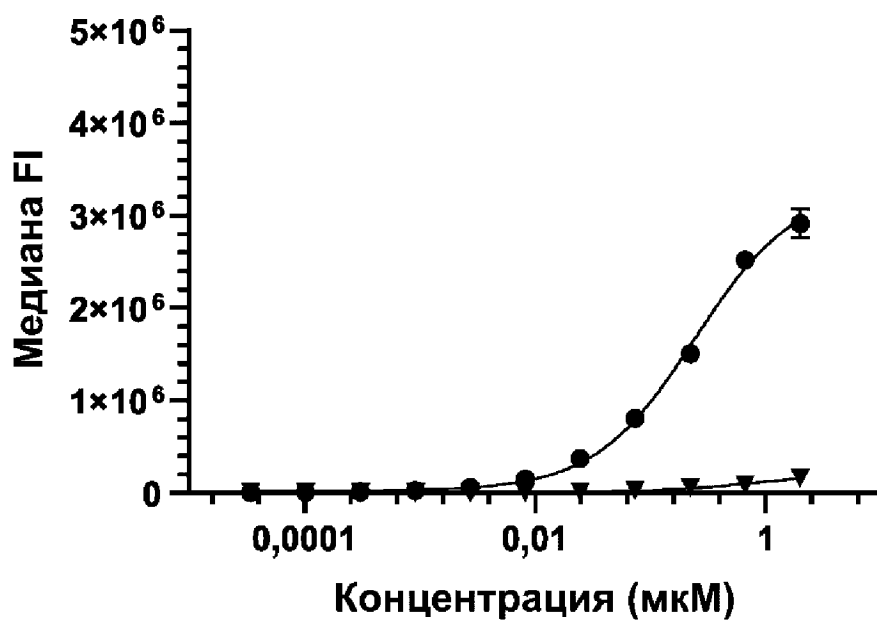
ММ1R дикого типа

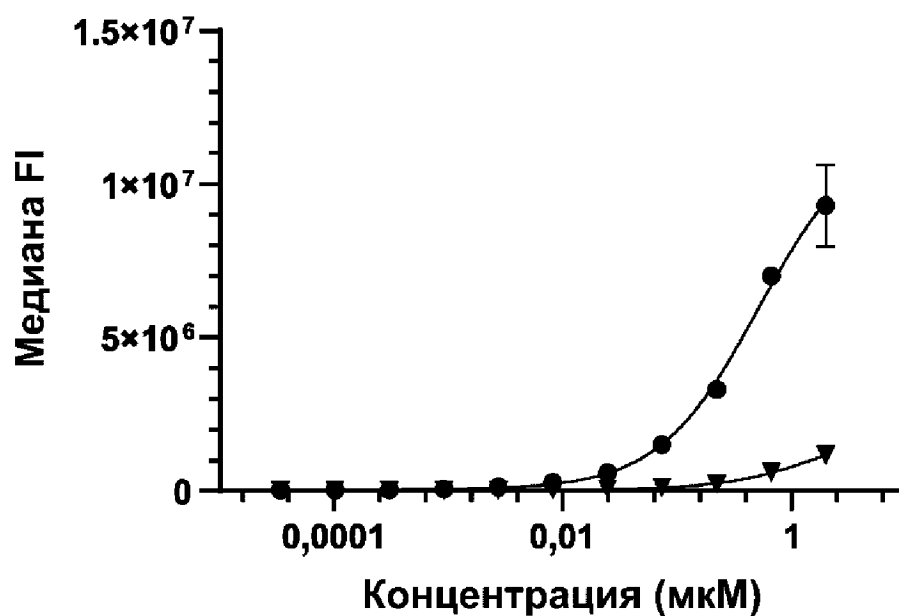
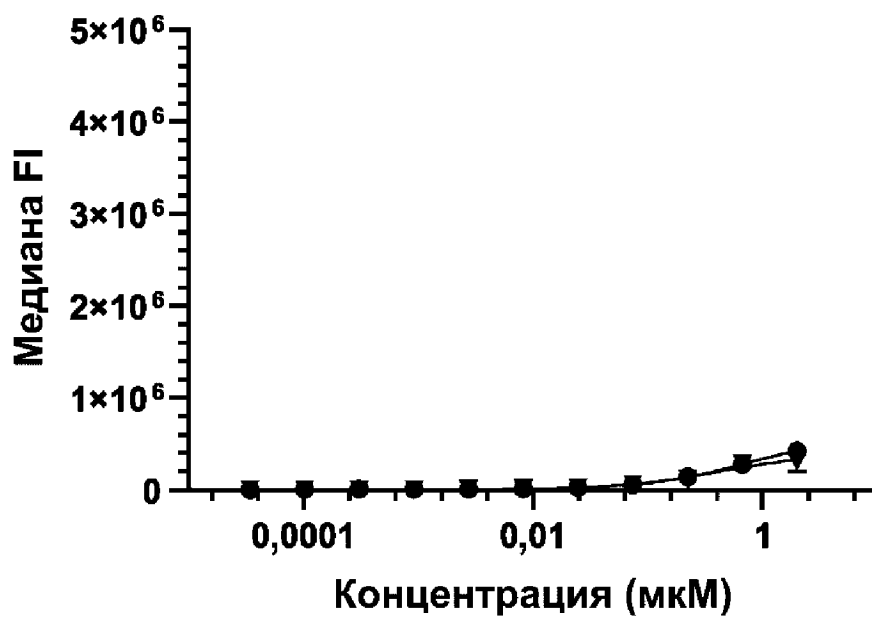
**ФИГ. 8Б**

ММ1R GPRC5D-KO



ФИГ. 8В**MM1R BCMA-KO****ФИГ. 8Г****MM1R GPRC5D/BCMA-KO**

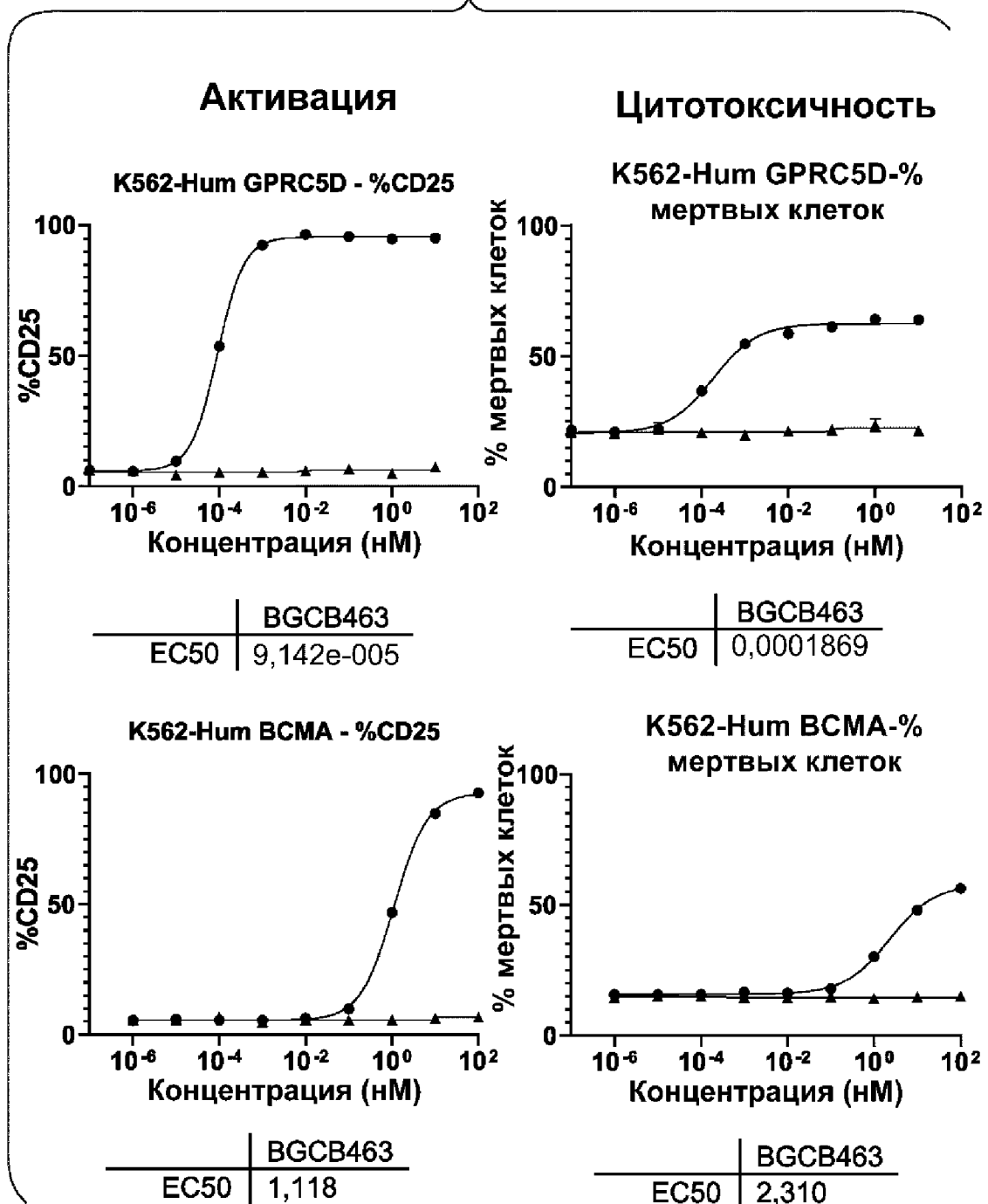
ФИГ. 9А**K562-Hum GPRC5D****ФИГ. 9Б****K562-Hum BCMA**

ФИГ. 9В**K562-Супо GPRC5D****ФИГ. 9Г****K562-Супо ВСМА**

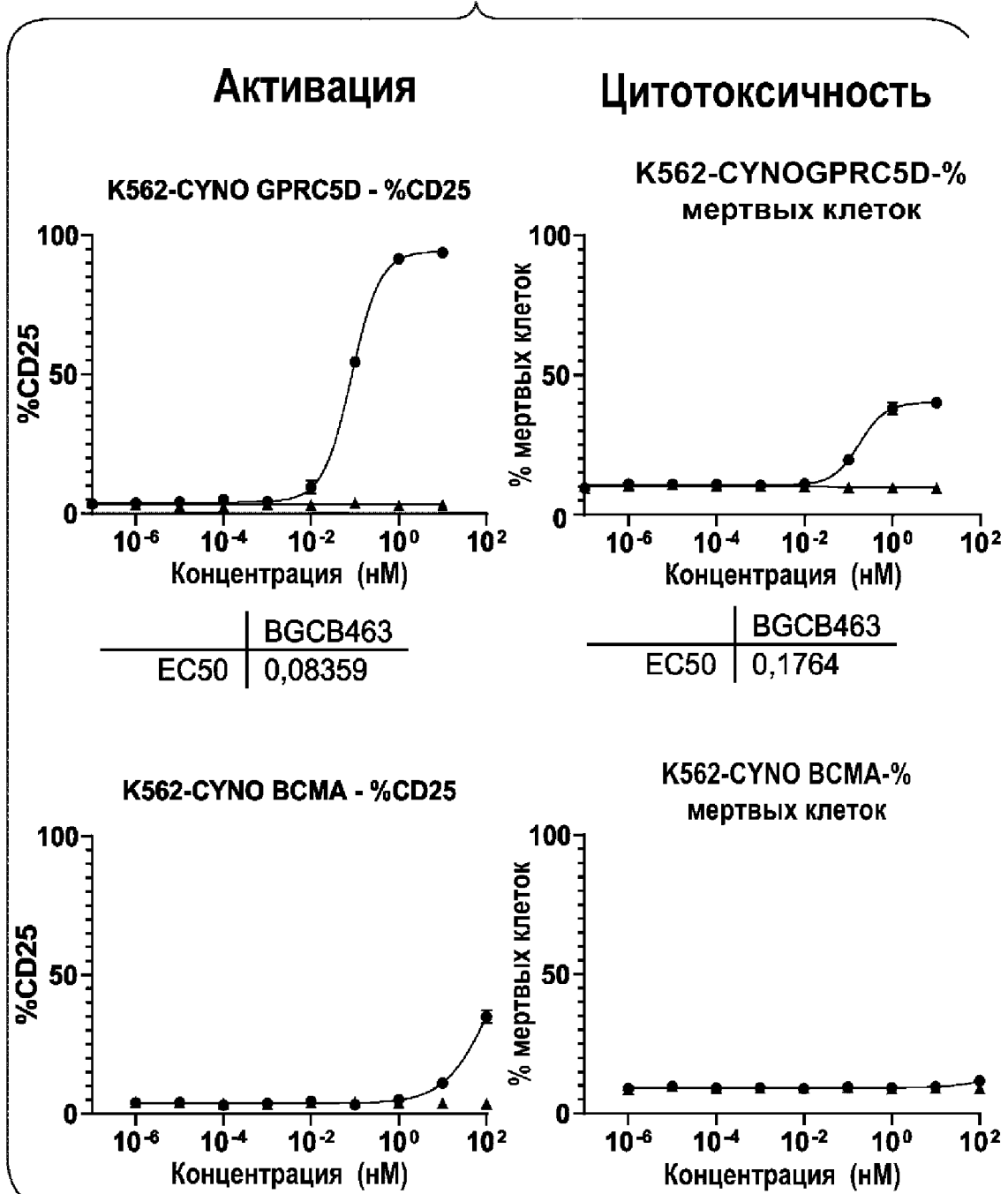
ФИГ. 9Д

	BGCB463 EC50 (нМ) прогон 1	BGCB463 EC50 (нМ) прогон 2	EC50 AVE	BGCB463 EC90 (нМ) прогон 1	BGCB463 EC90 (нМ) прогон 2	EC90 AVE
GPRC5D человека	12,5	49,7	31.1	142,6	208,7	175,7
GPRC5D яванского макака	435,1	309,7	372,4	2989,8	2058,6	2524,2
BCMA человека	248,0	45,8	146,9	2333,8	192,5	1263,2
BCMA яванского макака	Нет подгонки	Нет подгонки	Нет подгонки	Нет подгонки	Нет подгонки	Нет подгонки

ФИГ. 10А



ФИГ. 10Б

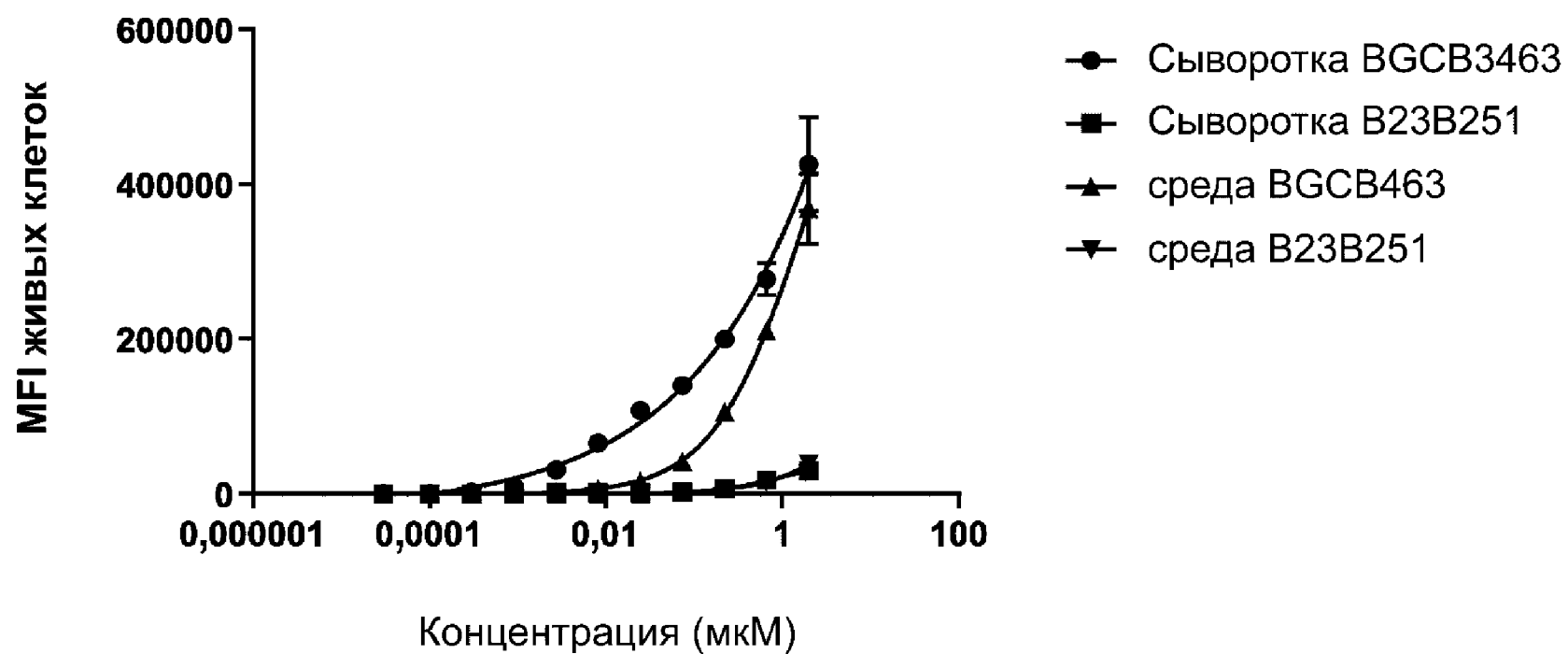


ФИГ. 11



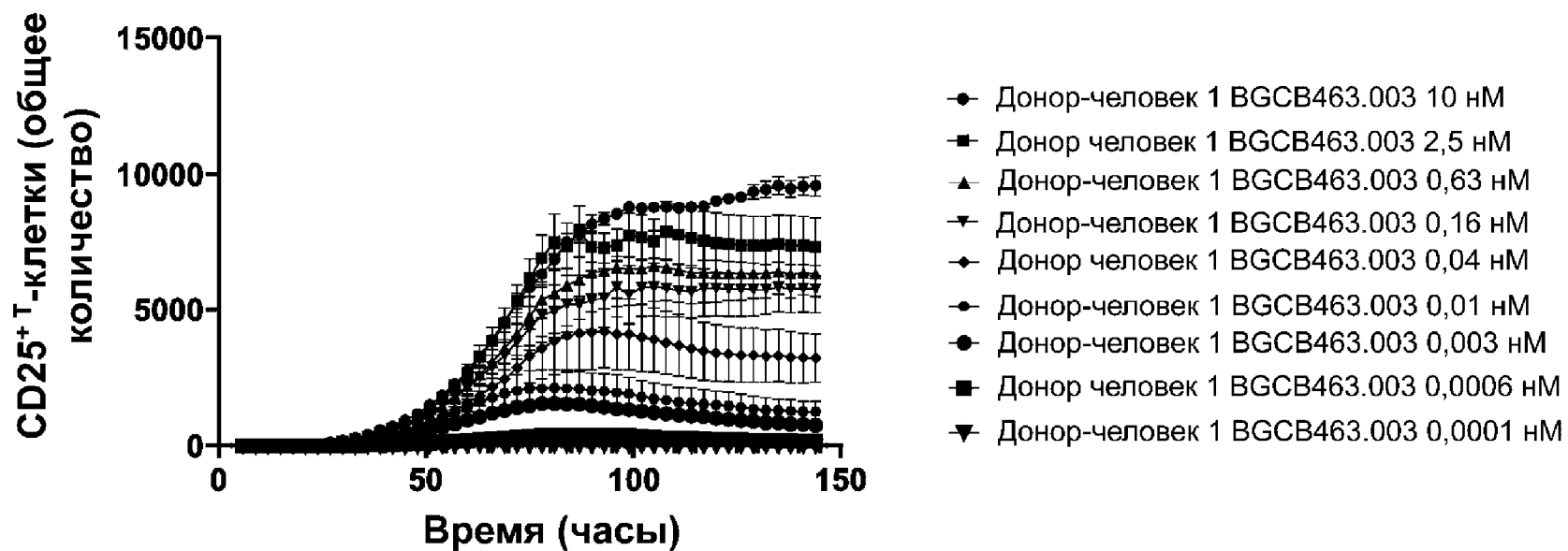
ФИГ. 12

Донор D327645

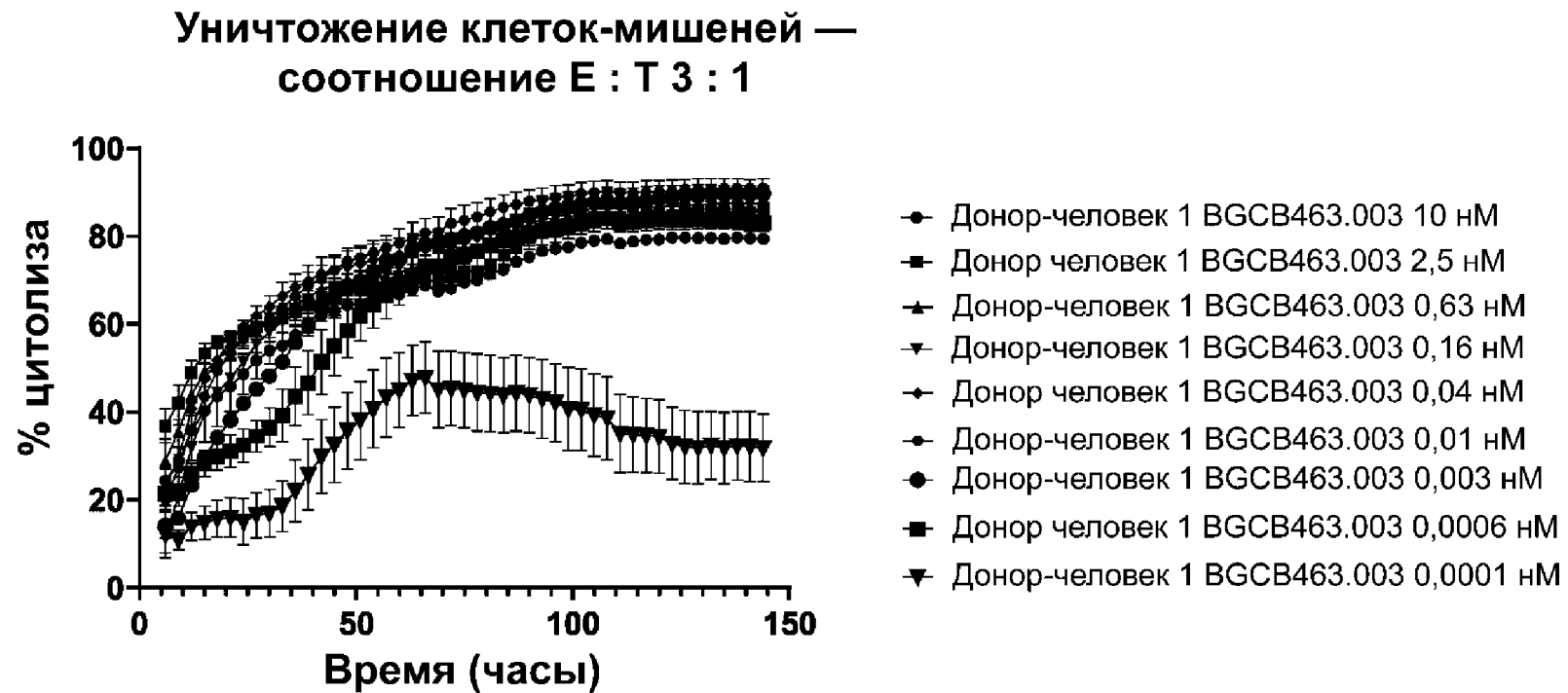


ФИГ. 13А

Активация Т-клеток — соотношение Е : Т 3 : 1

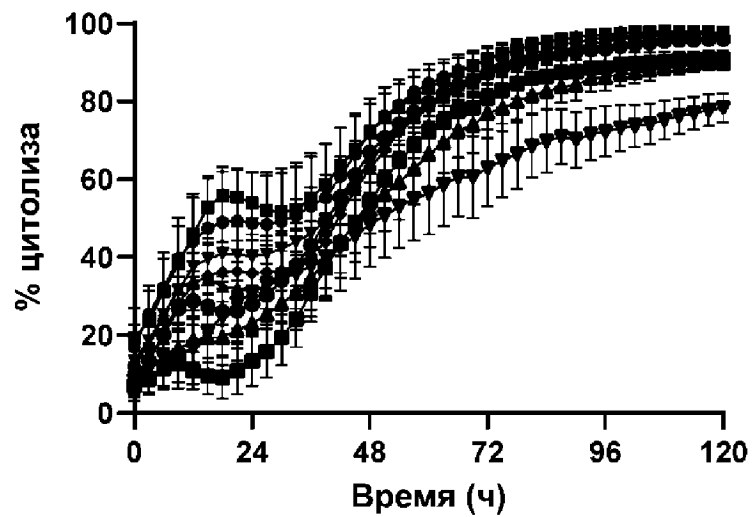


ФИГ. 13Б



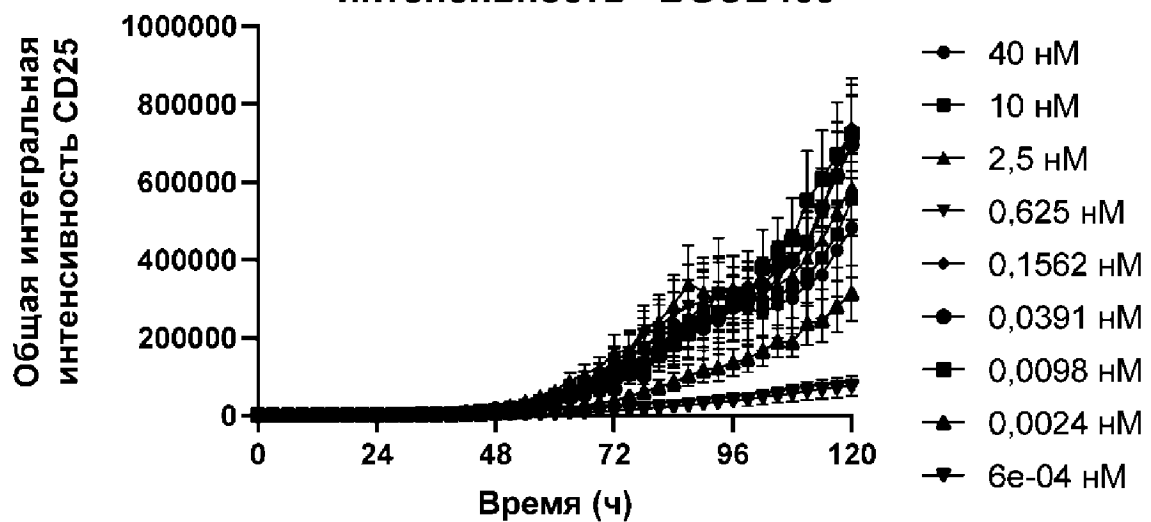
ФИГ. 14А

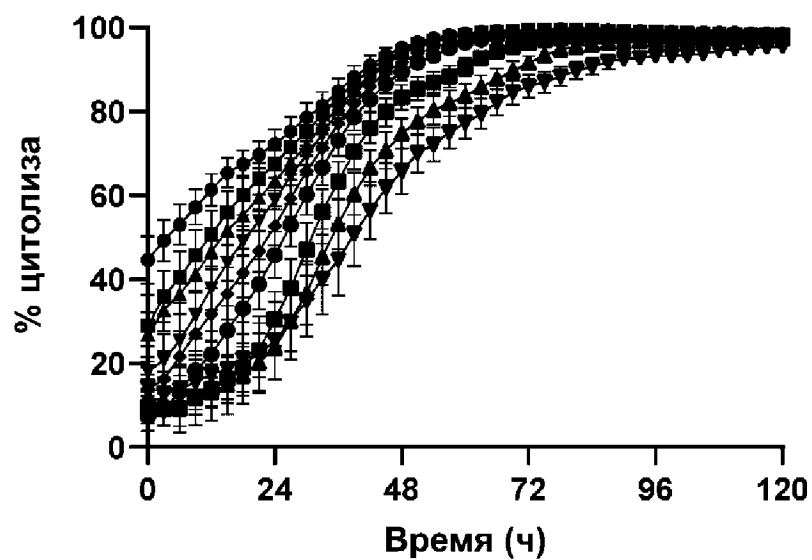
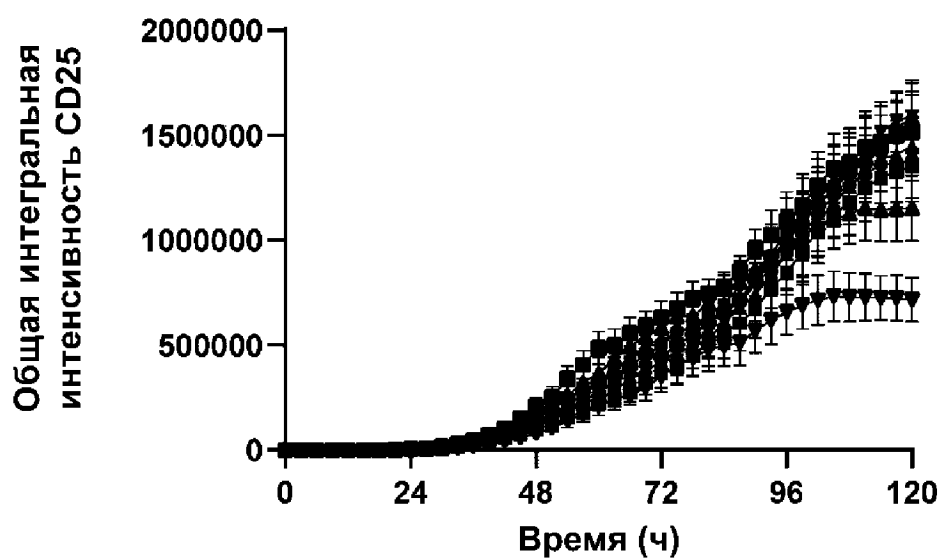
1 : 1-% цитолиза - BGCB463

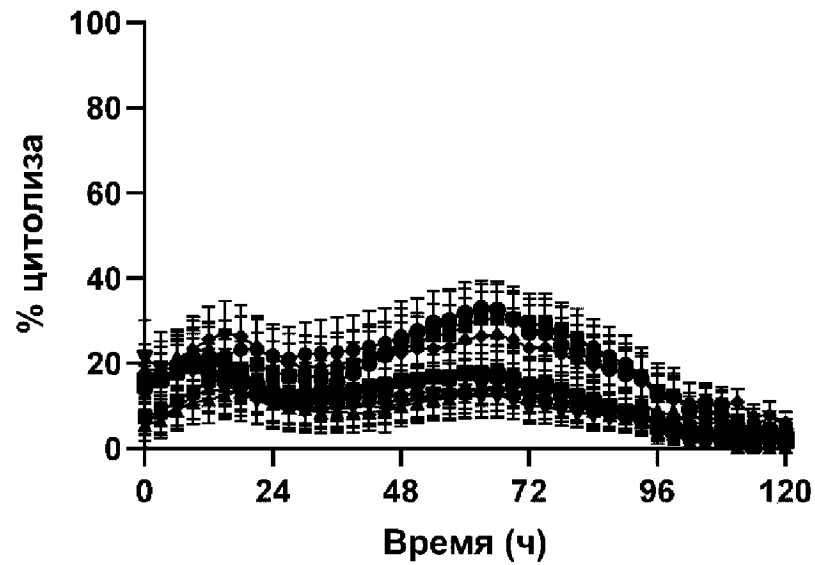
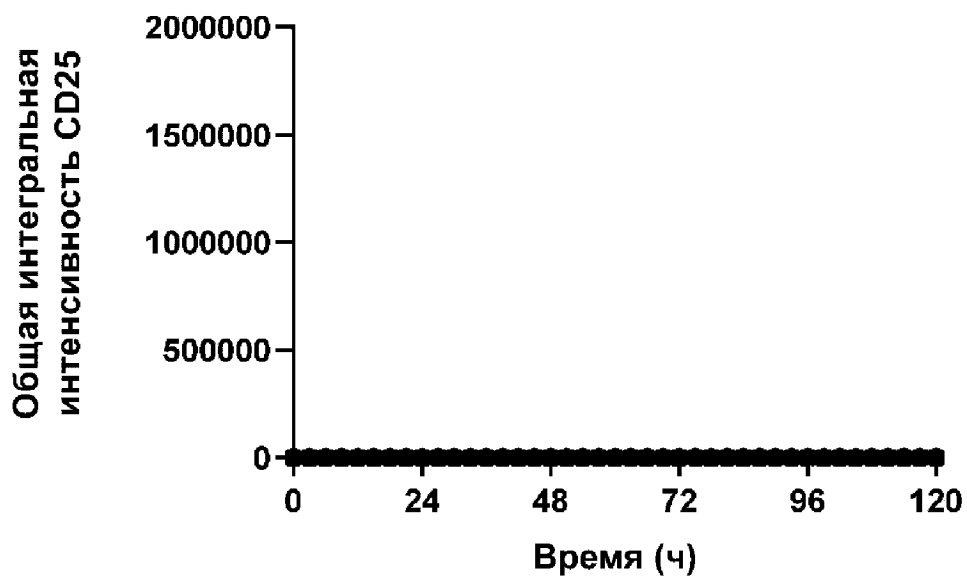


ФИГ. 14Б

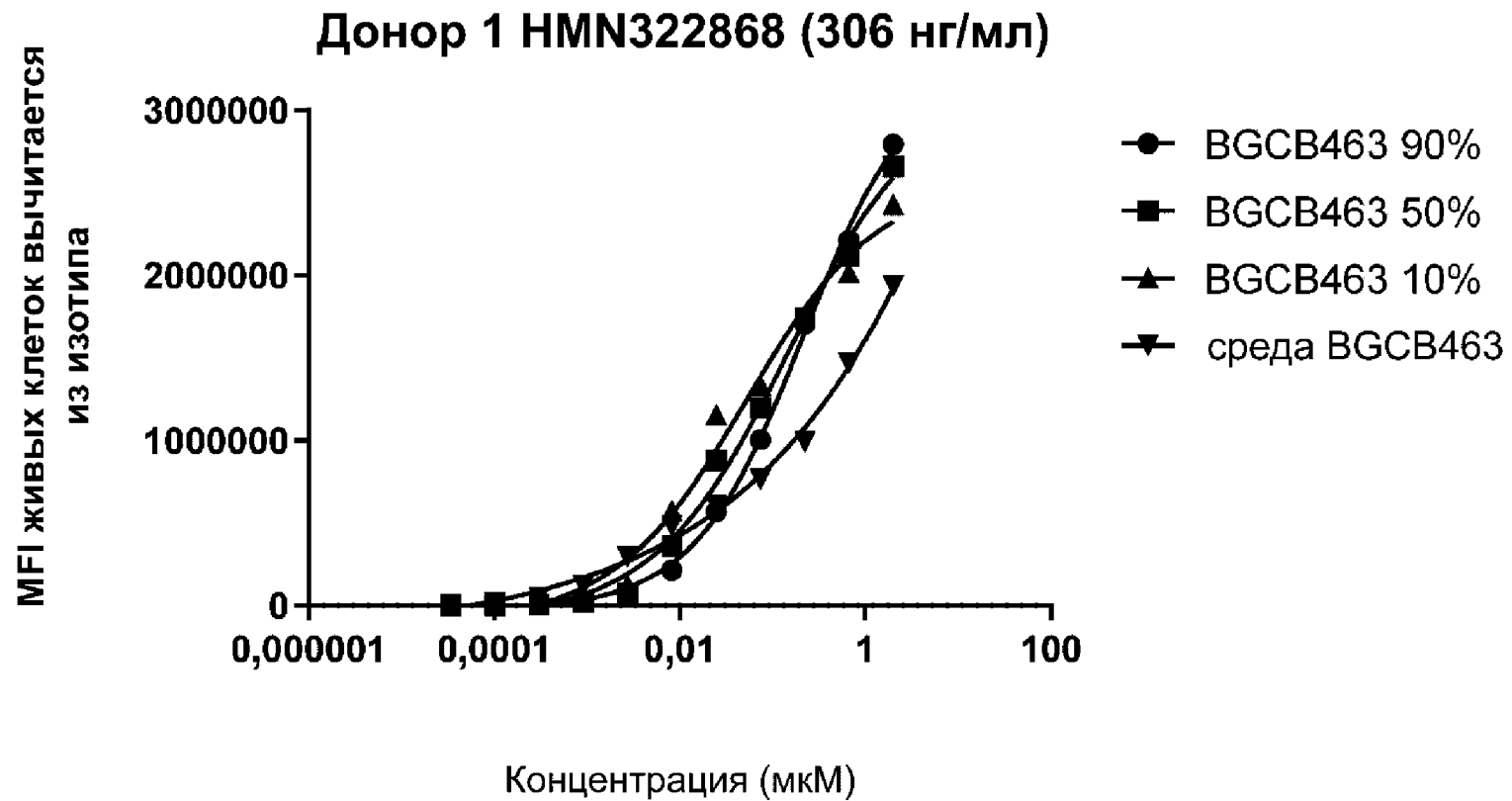
1 : 1 - CD25 - общая интегральная интенсивность - BGCB463



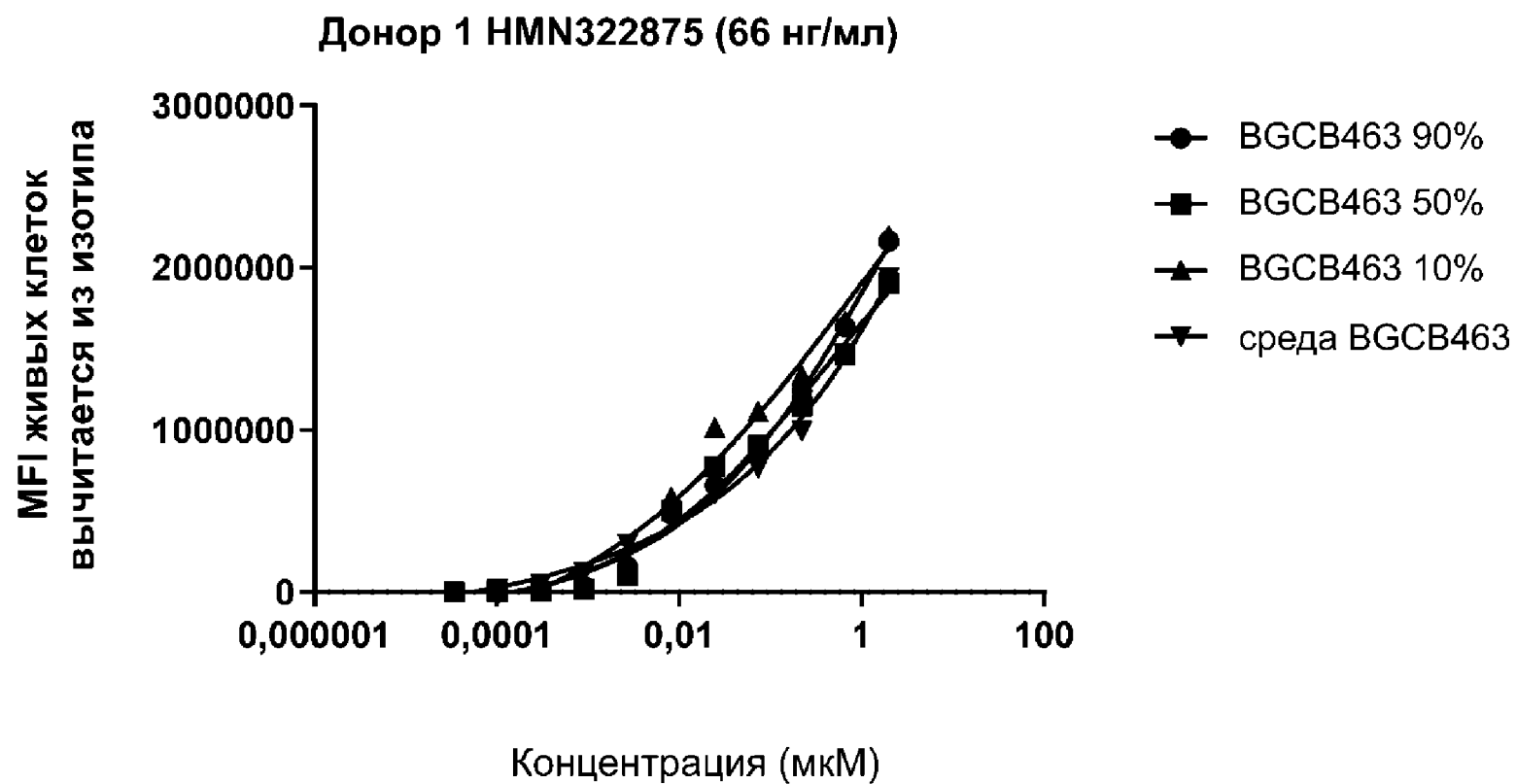
ФИГ. 14В**5 : 1-% цитолиза - BGCB463****ФИГ. 14Г****5 : 1 - CD25 - общая интегральная
интенсивность - BGCB463**

ФИГ. 14Д**5 : 1-% цитолиза - изотип (B23B251)****ФИГ. 14Е****5 : 1 - CD25 - общая интегральная интенсивность - изотип (B23B251)**

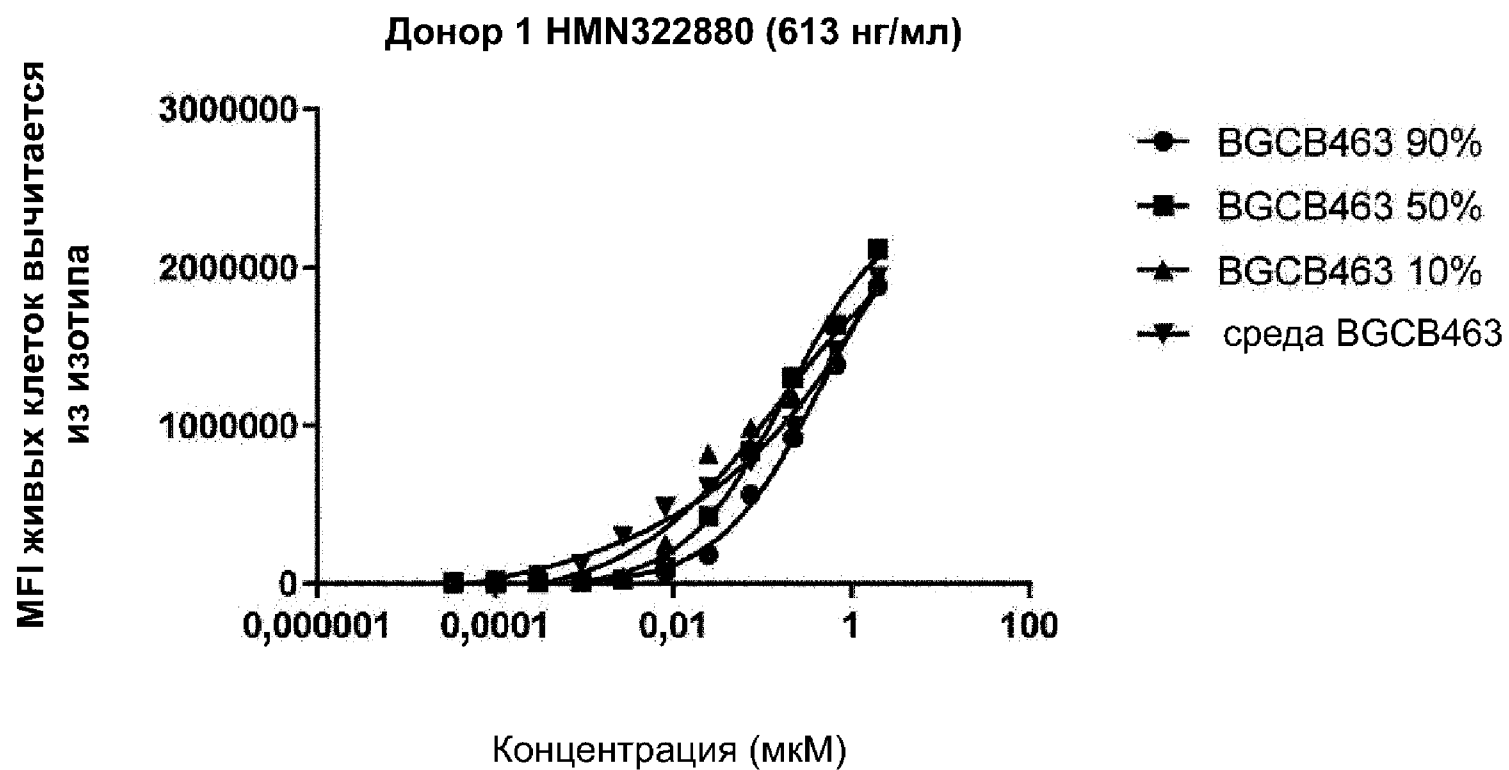
ФИГ. 15А



ФИГ. 15Б

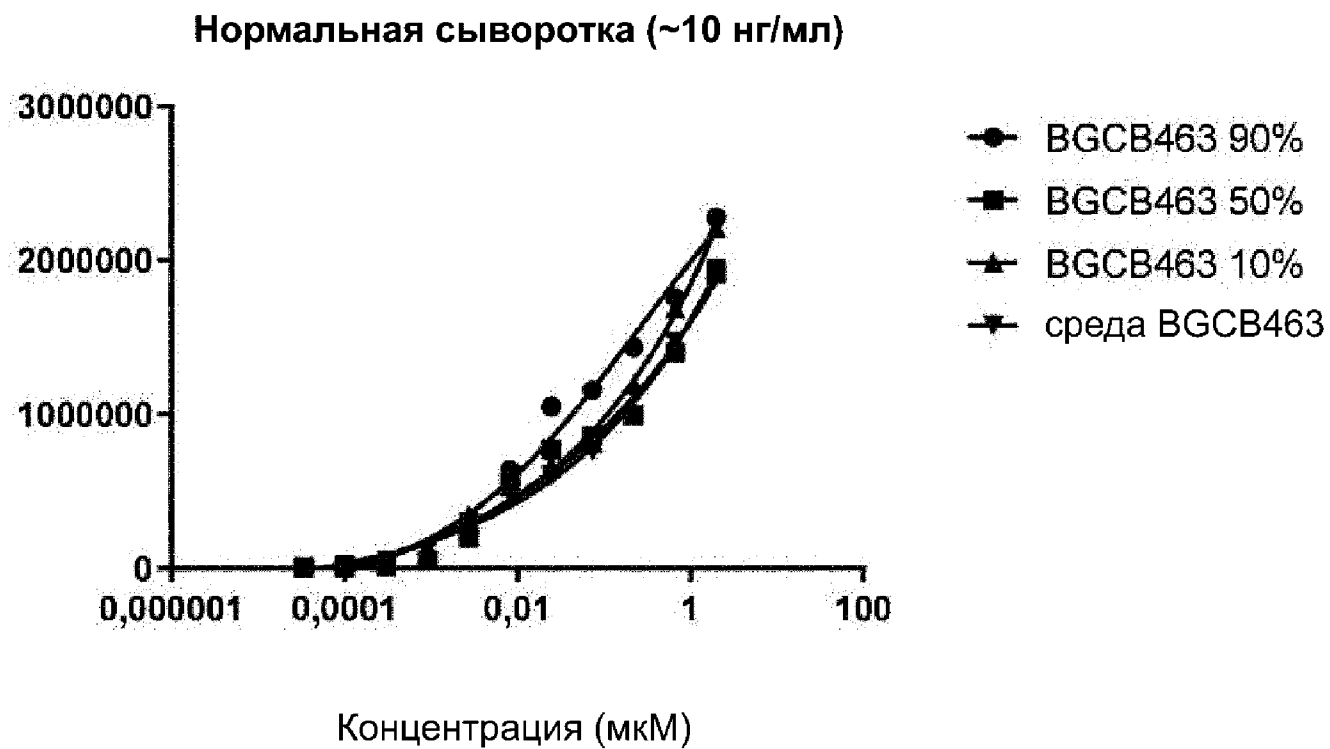


ФИГ. 15В

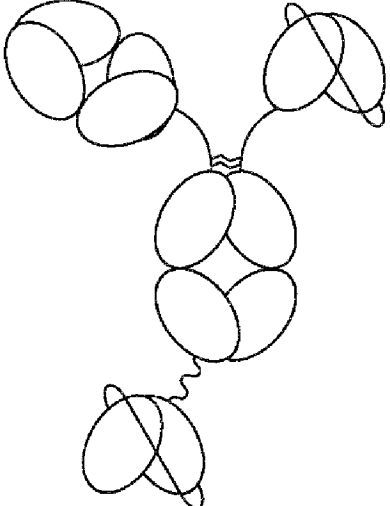


ФИГ. 15Г

МFI живых клеток вычитается из изотипа

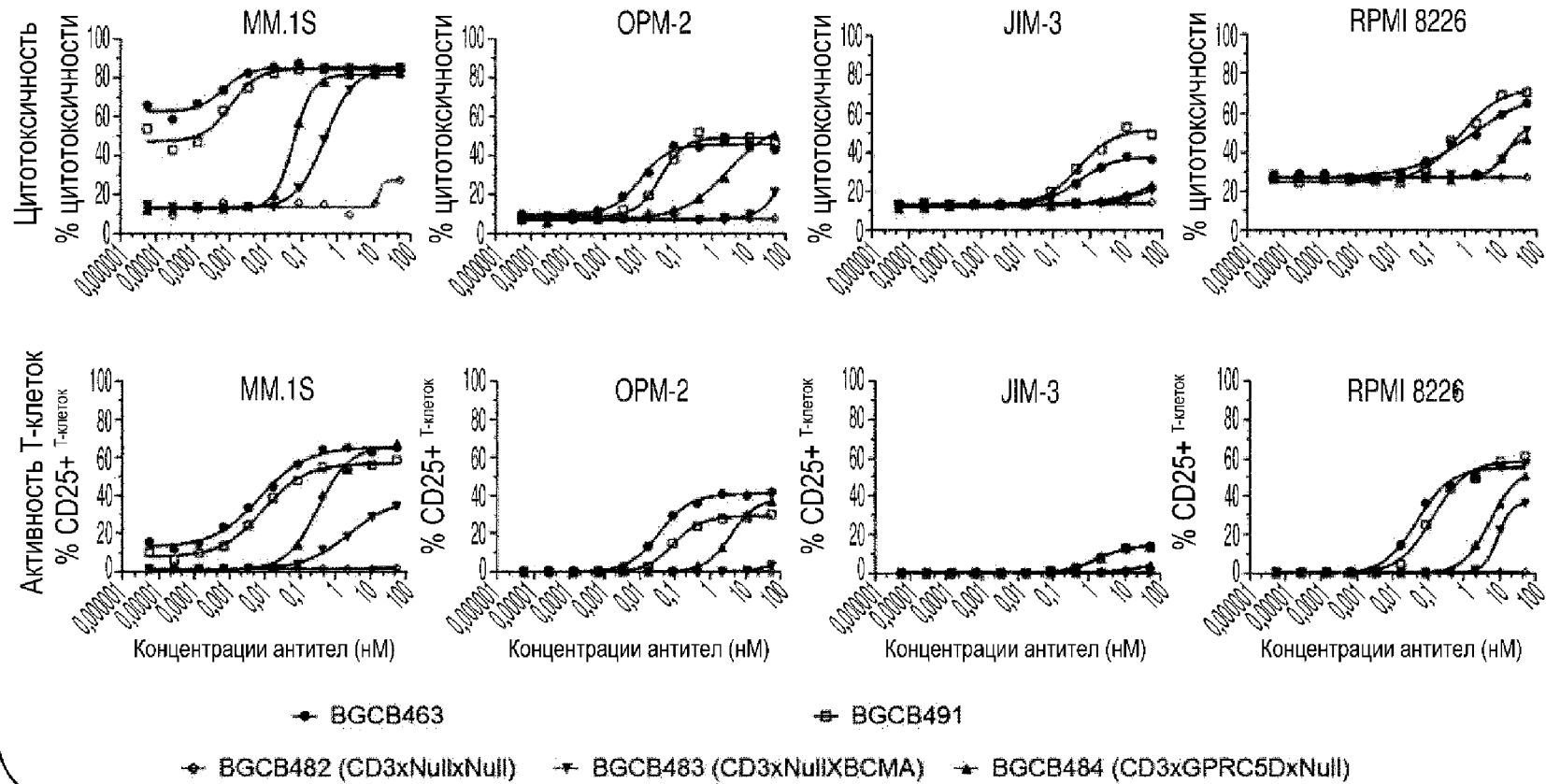


ФИГ. 16

Fab антитела к CD3		Выступ, AAS
Впадина, RF, AAS		Антитела к GPRC5d
Антитело к BCMA		

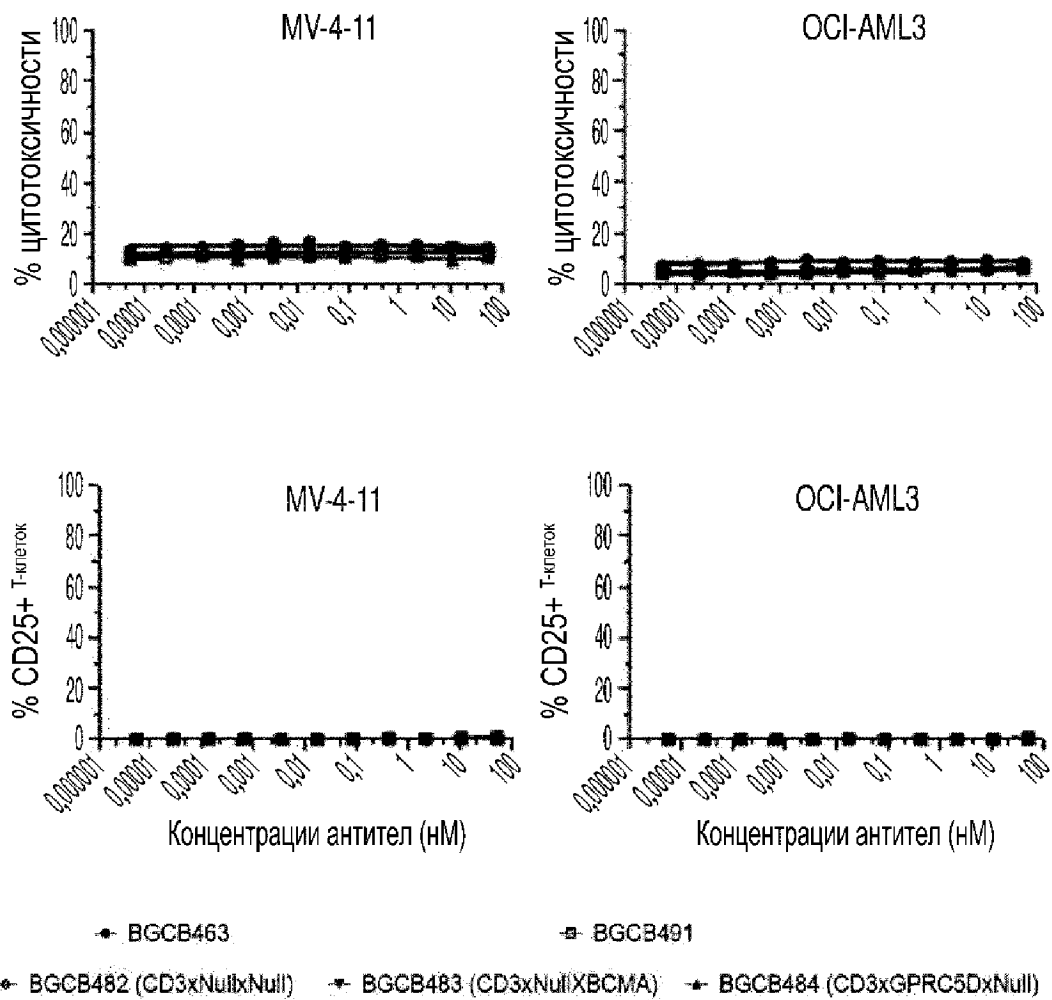
ФИГ. 17А

Клетки BCMA GPRC5D



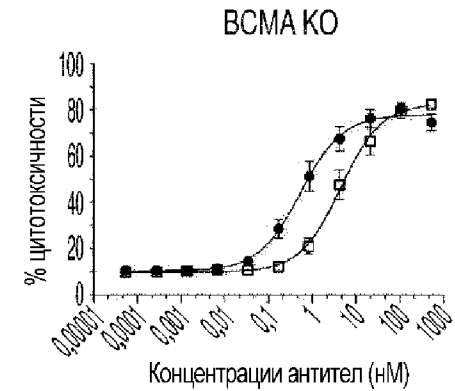
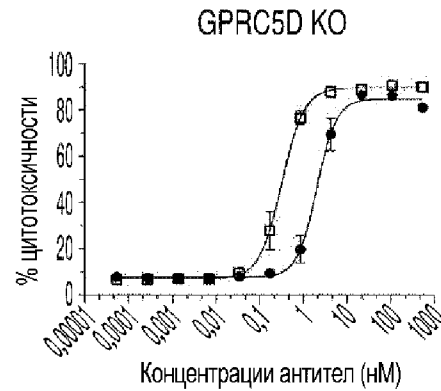
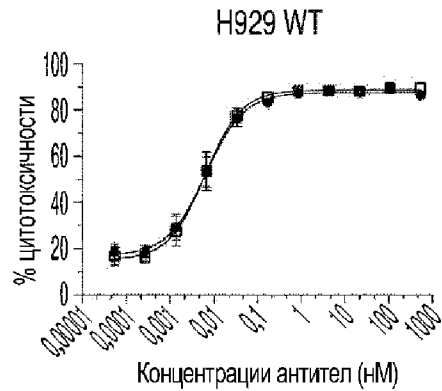
ФИГ. 17Б

BCMA⁺ GPRC5D-клетки

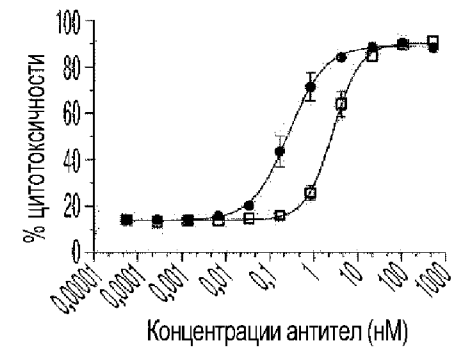
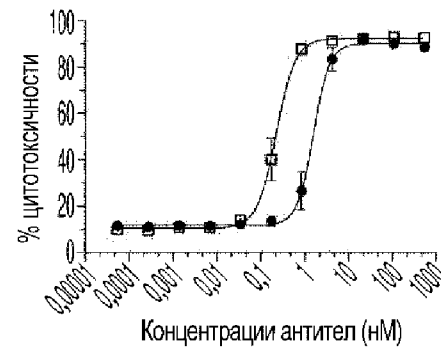
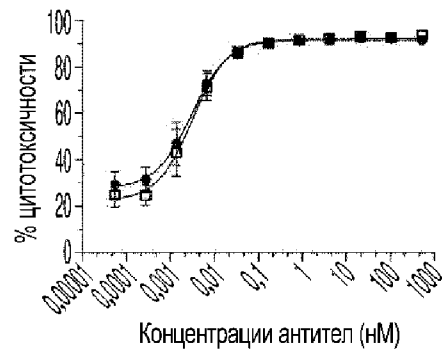


ФИГ. 18А

Инкубация 72 часа



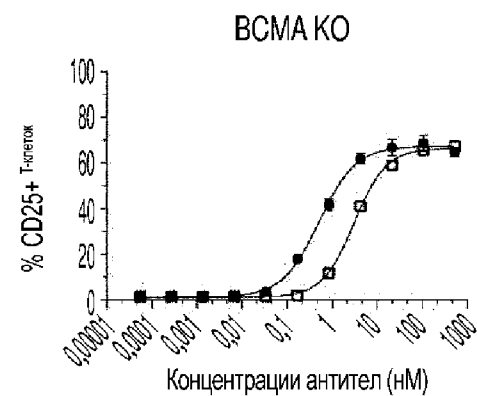
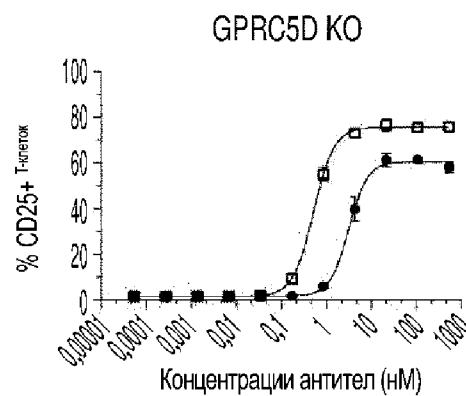
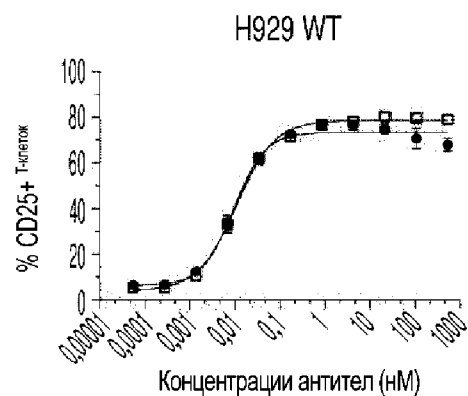
Инкубация 96 часов



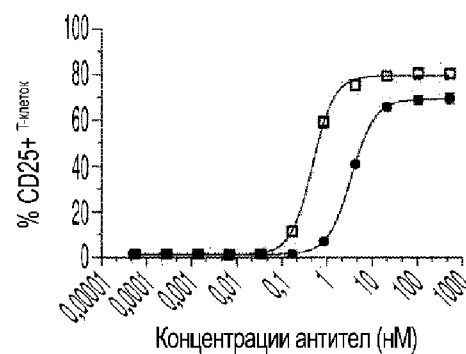
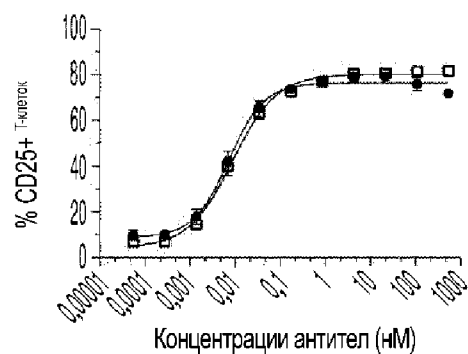
● BGCB463

■ BGCB491

Инкубация 72 часа



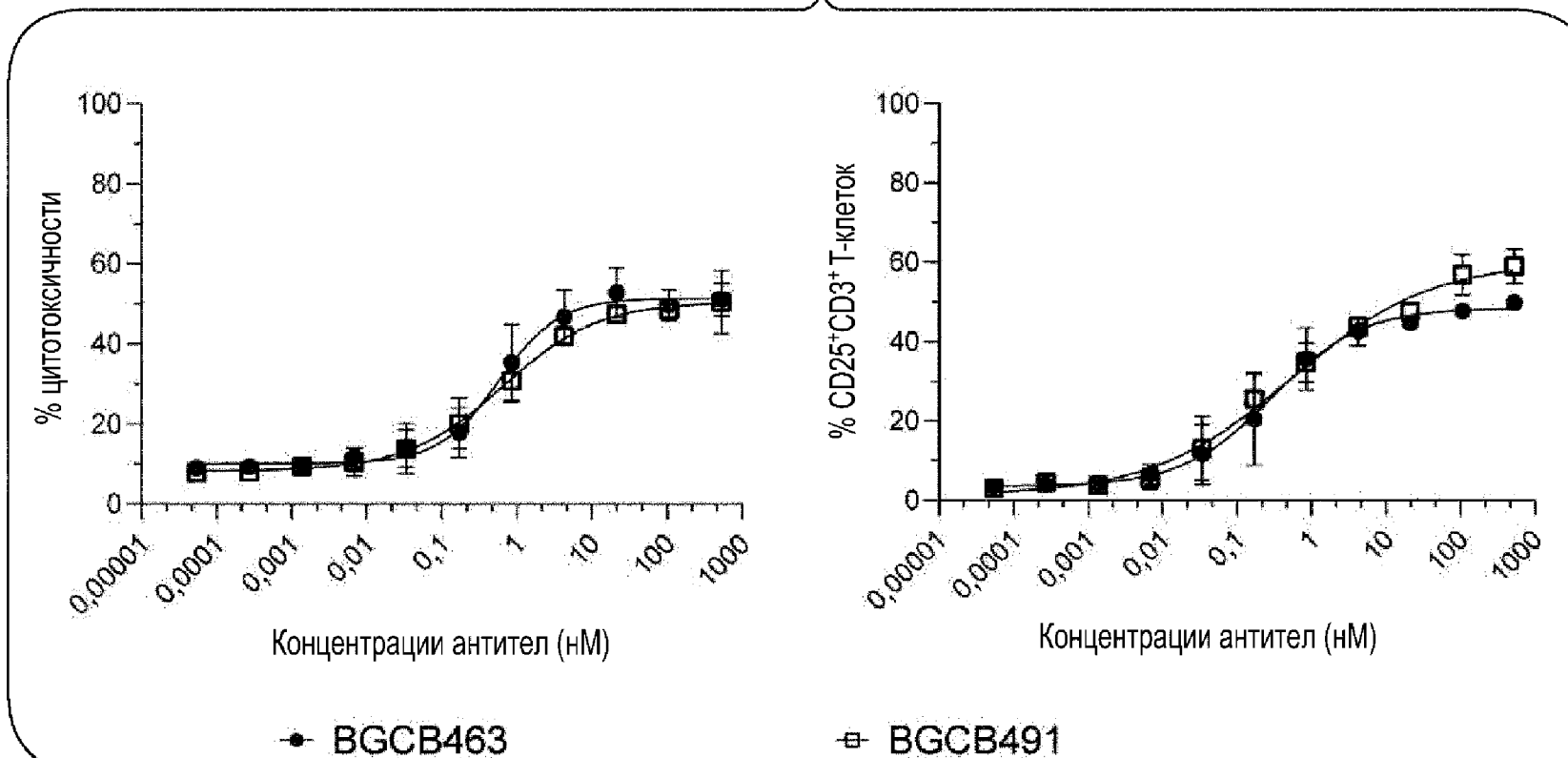
Инкубация 96 часов

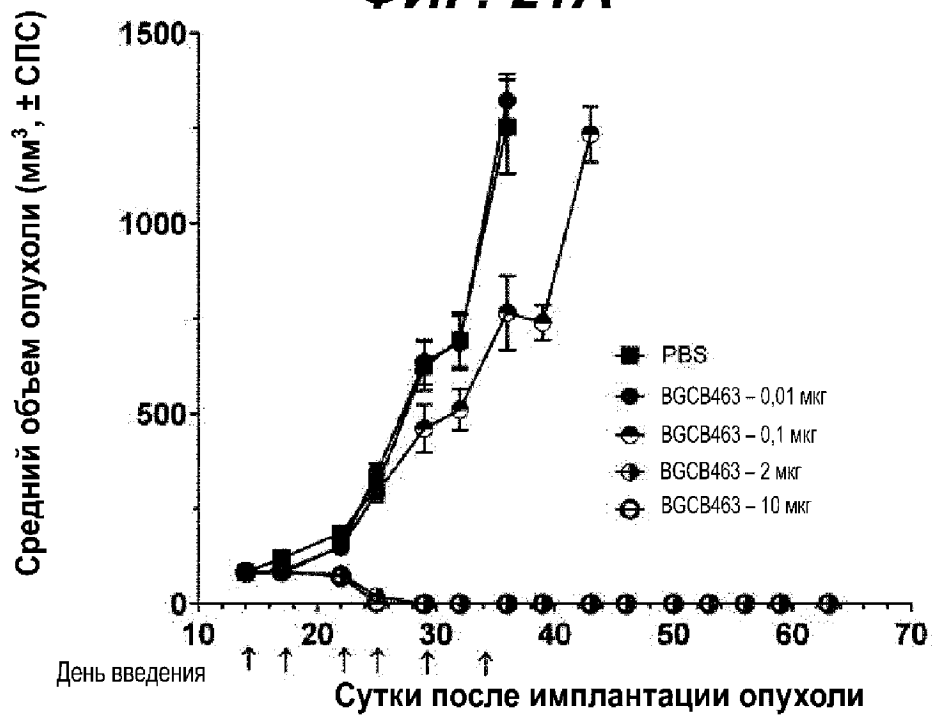
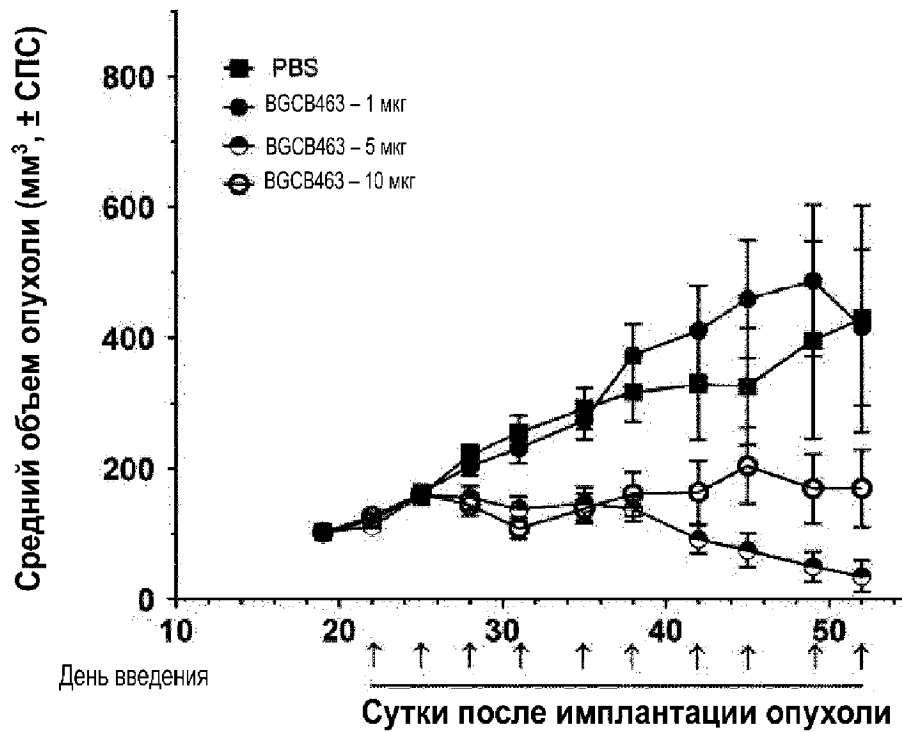


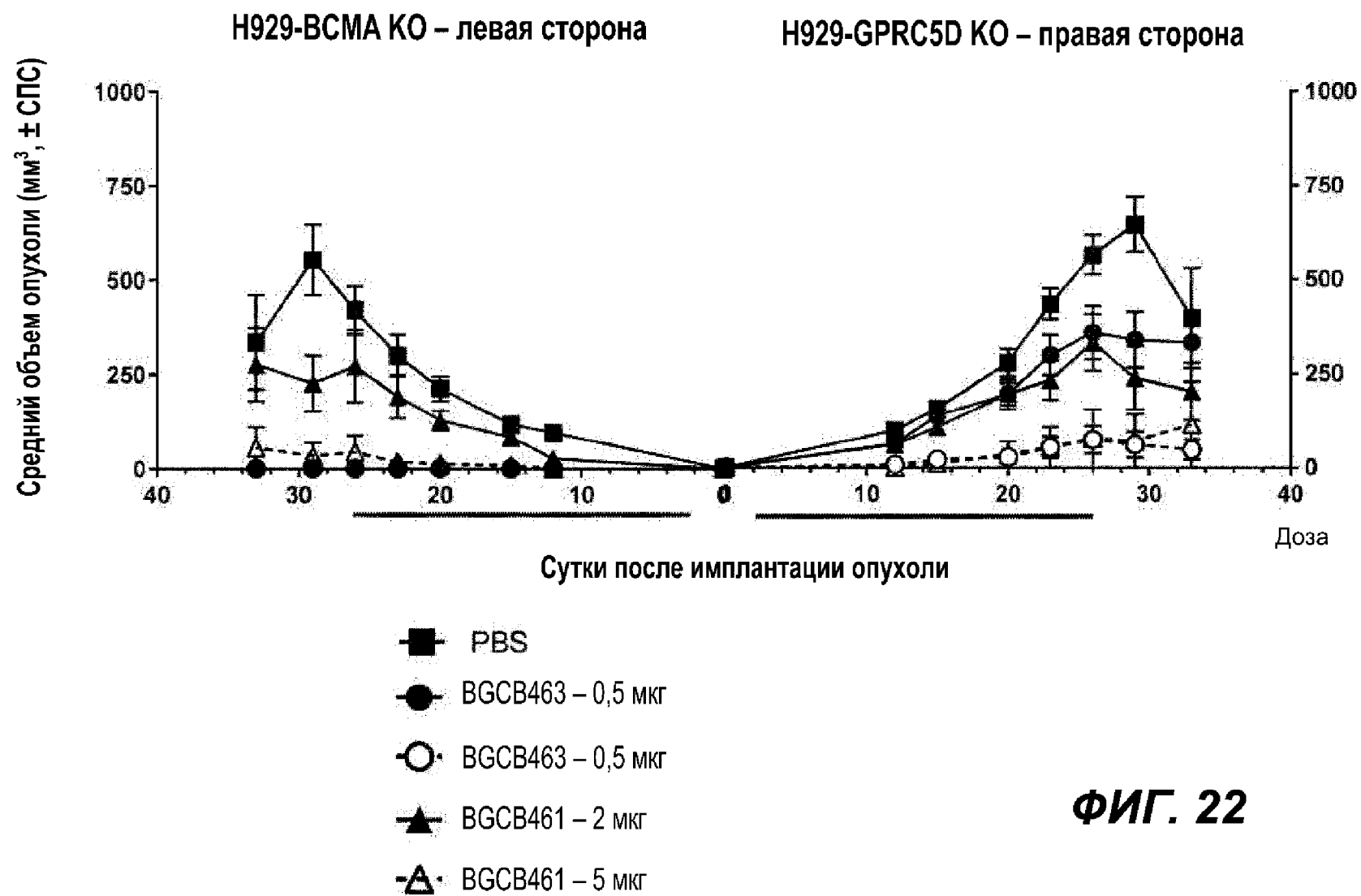
● BGCB463

□ BGCB491

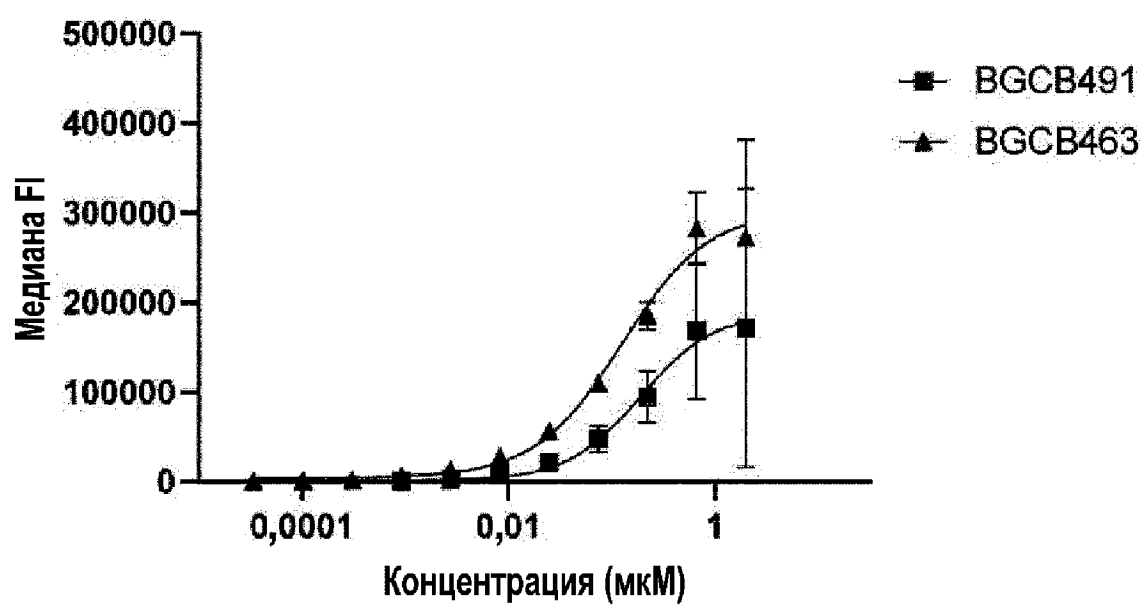
ФИГ. 20



ФИГ. 21А**ФИГ. 21Б**

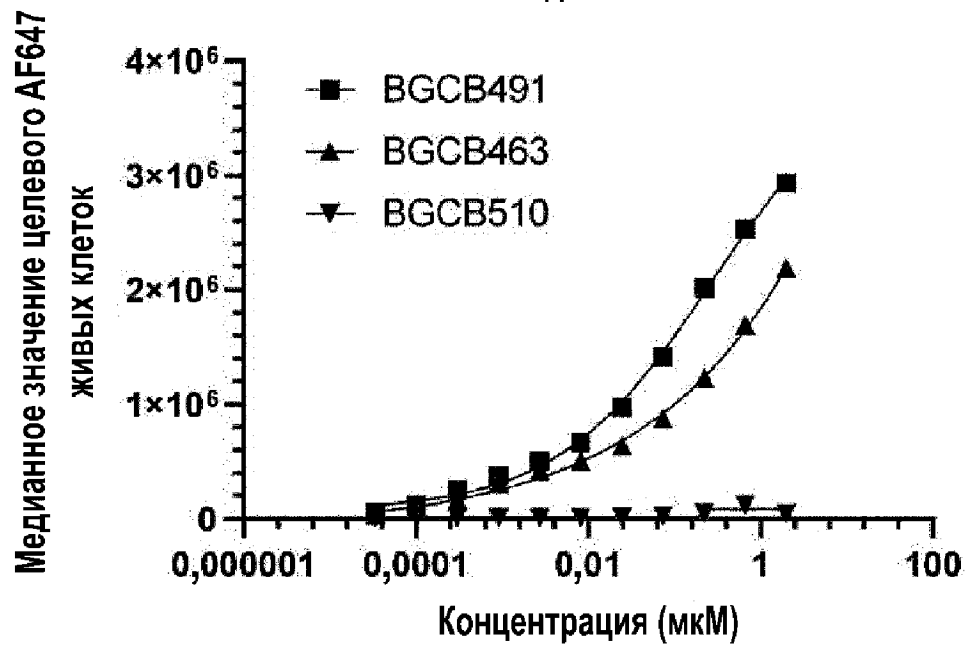


ФИГ. 22

ФИГ. 23

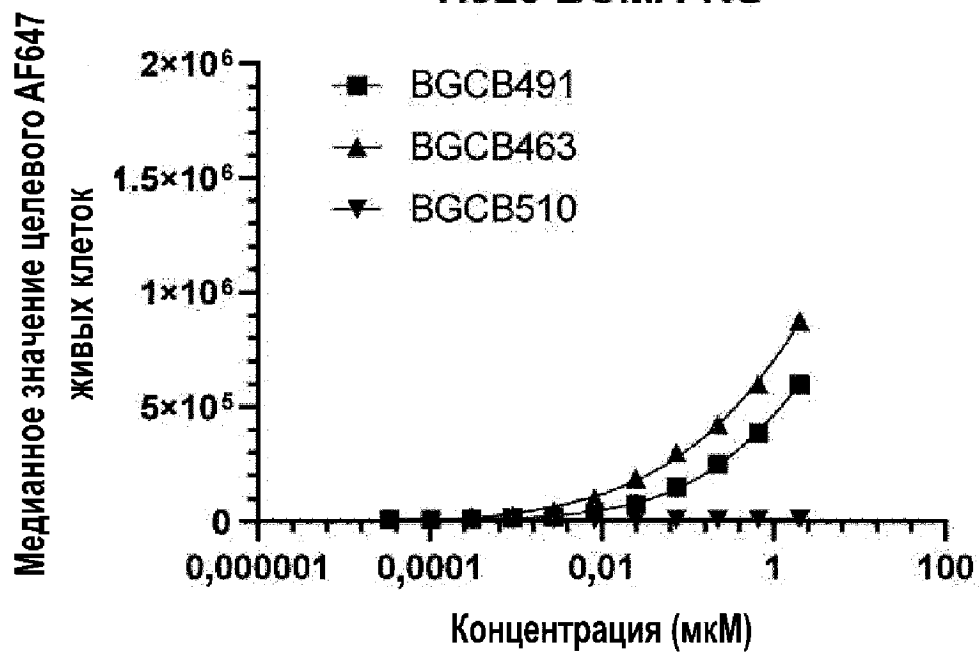
ФИГ. 24А

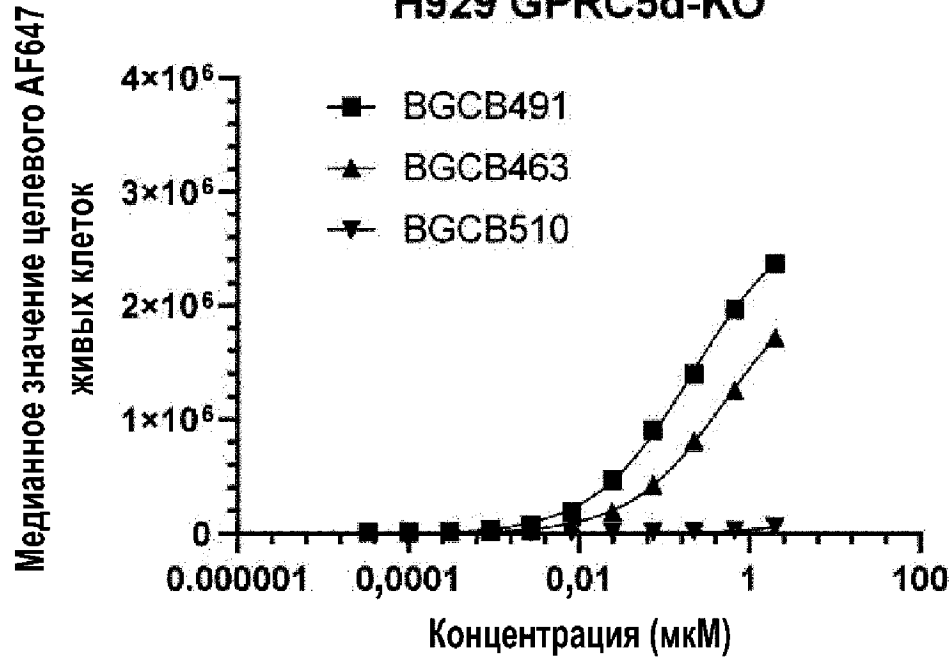
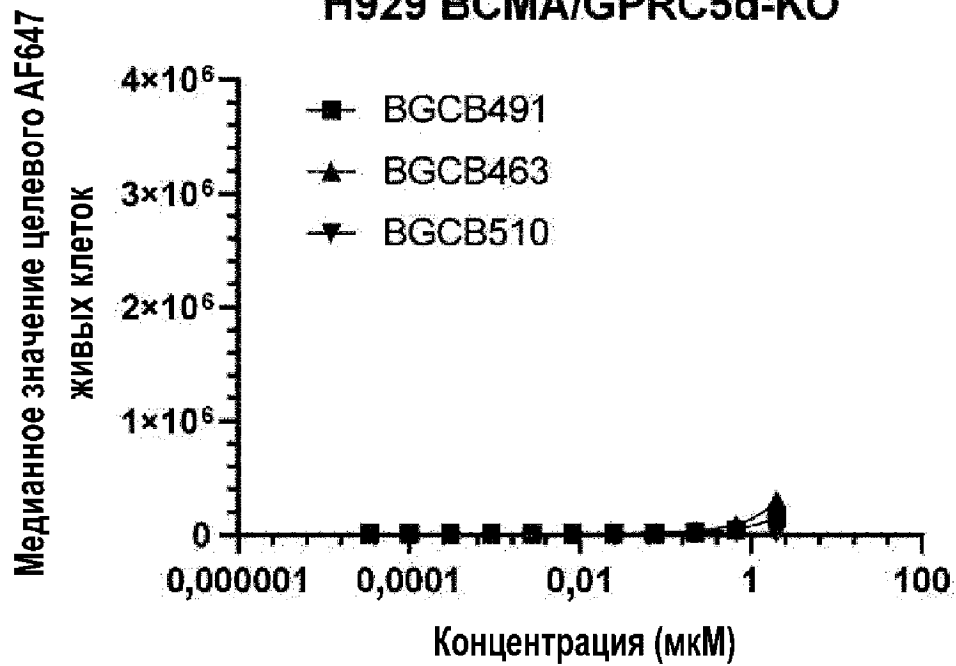
Н929 дикого типа



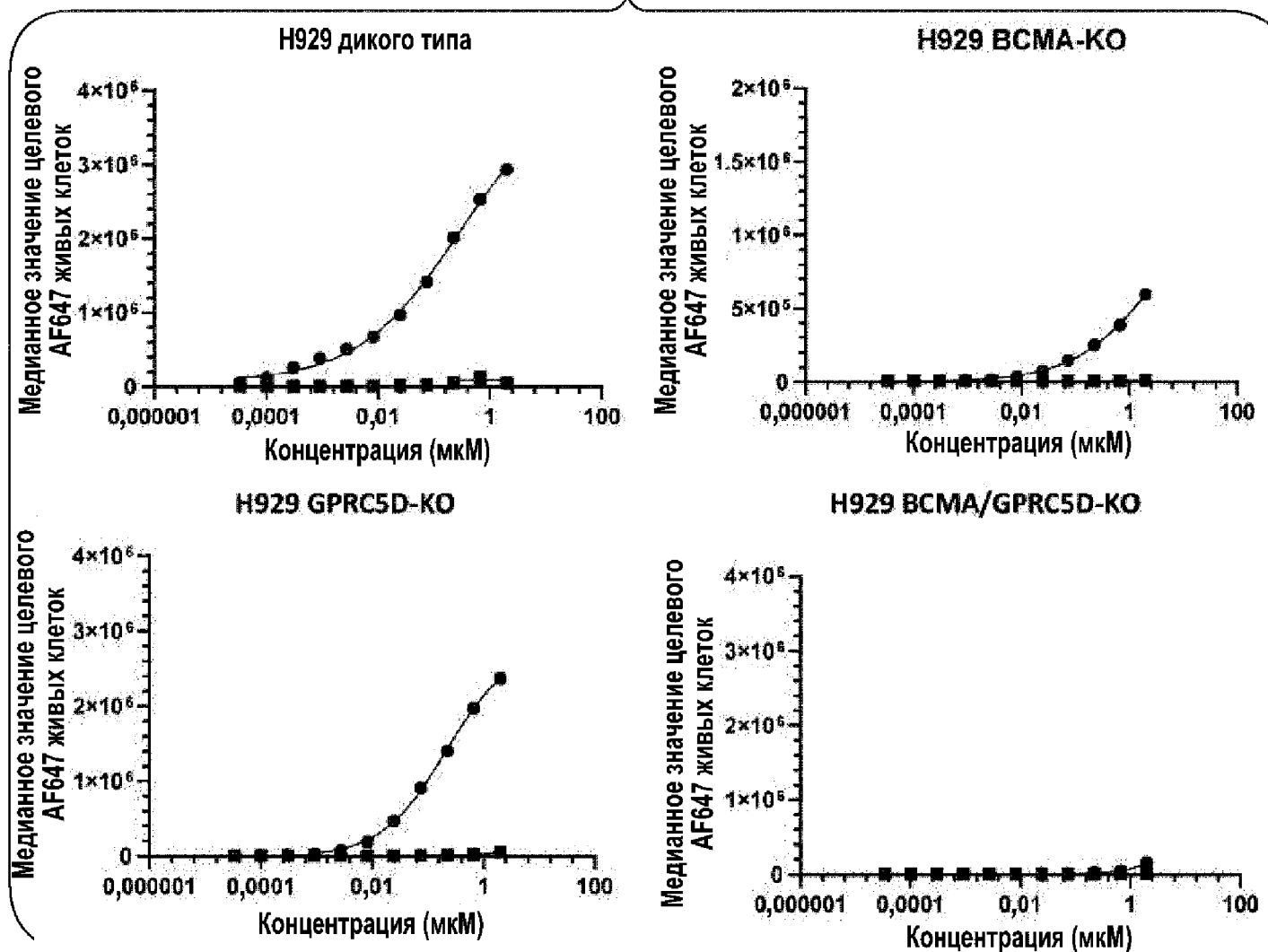
ФИГ. 24Б

Н929 ВСМА-КО



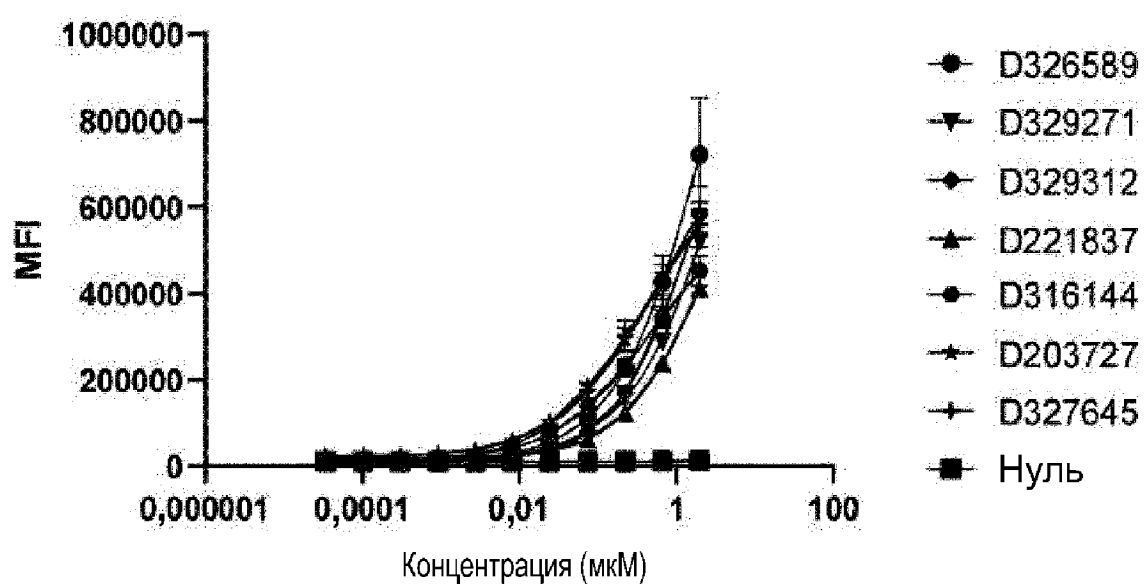
ФИГ. 24В**H929 GPRC5d-KO****ФИГ. 24Г****H929 BCMA/GPRC5d-KO**

ФИГ. 25

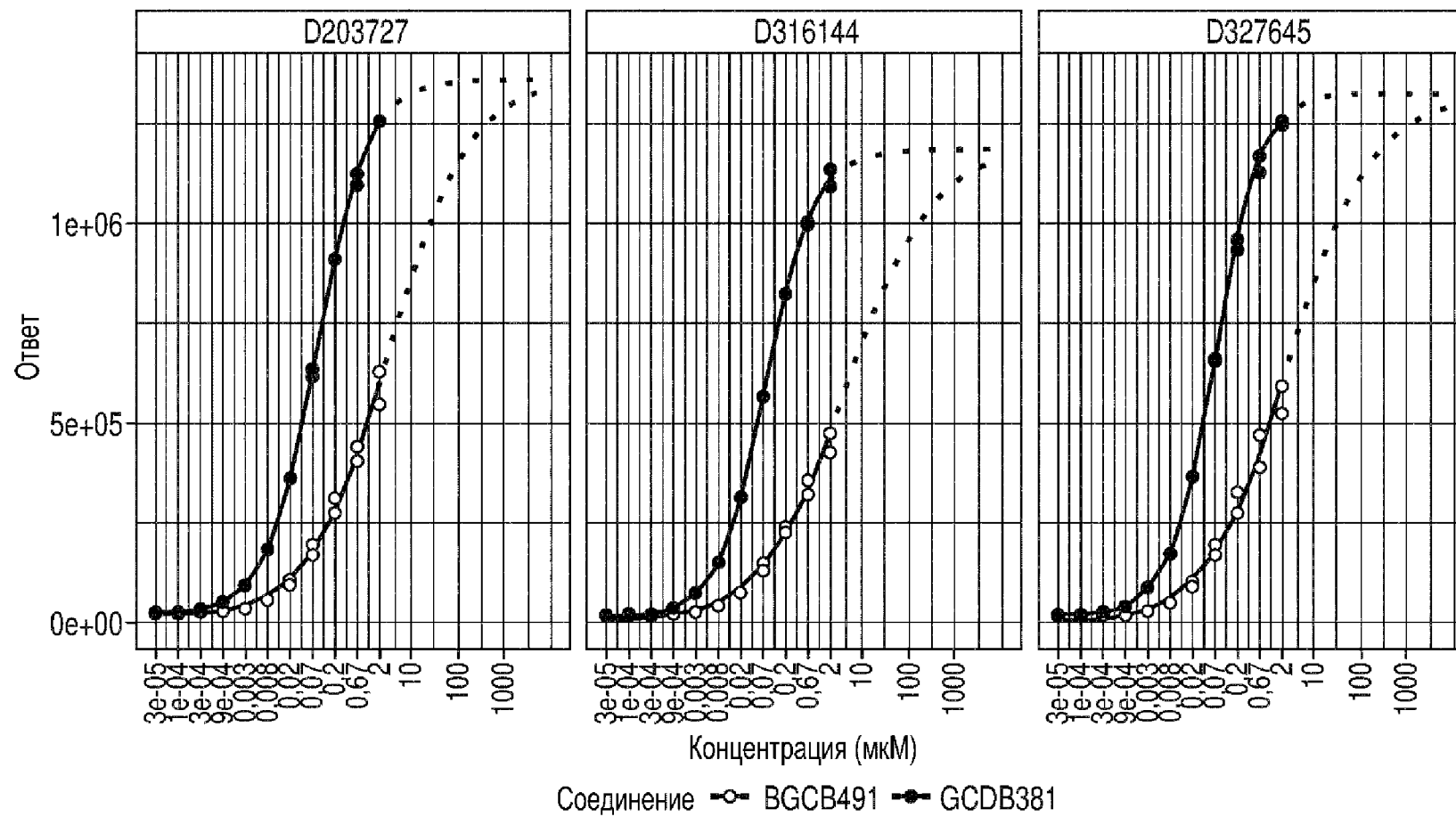


ФИГ. 26

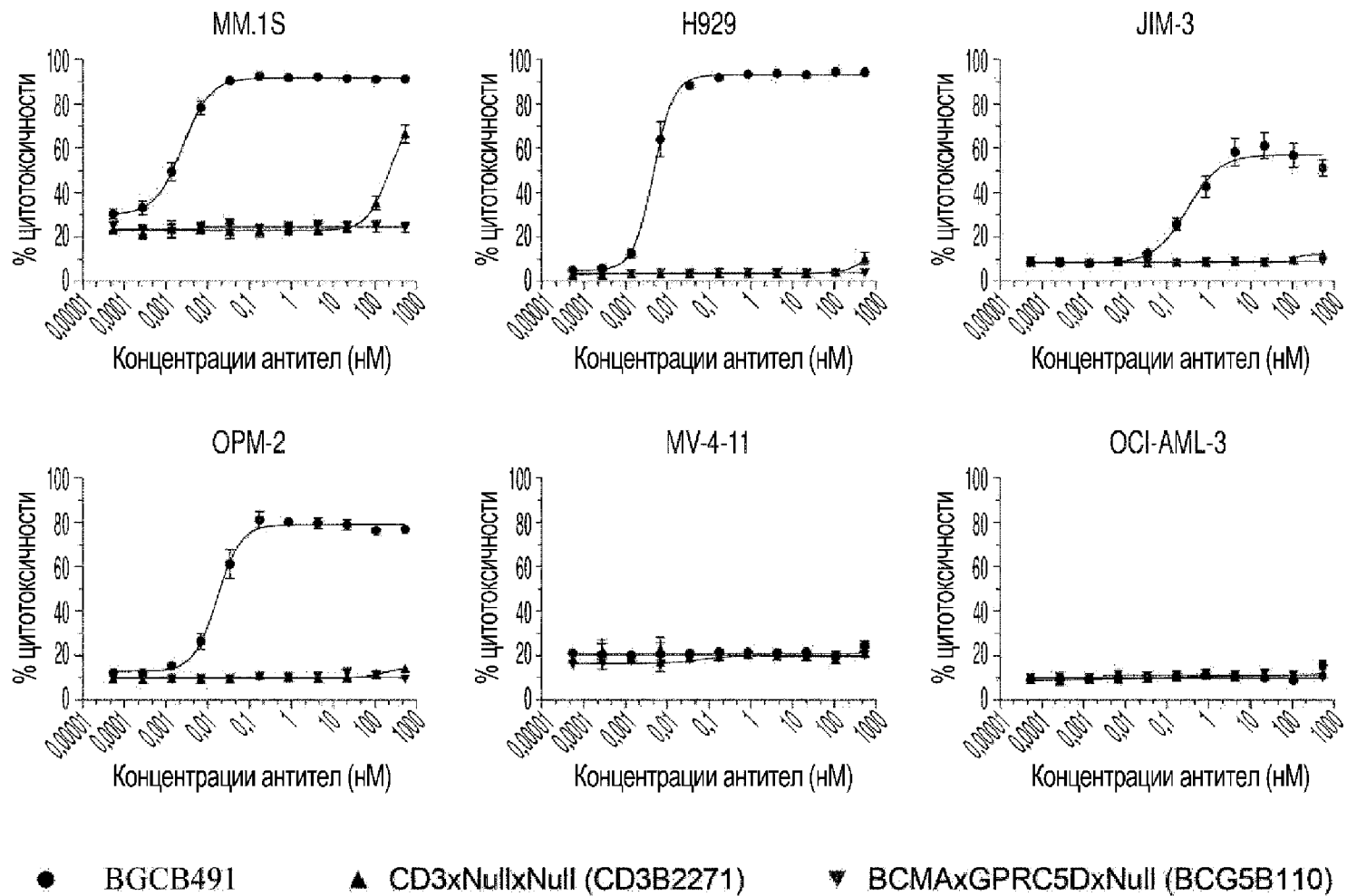
пан-Т клетки — 7 доноров



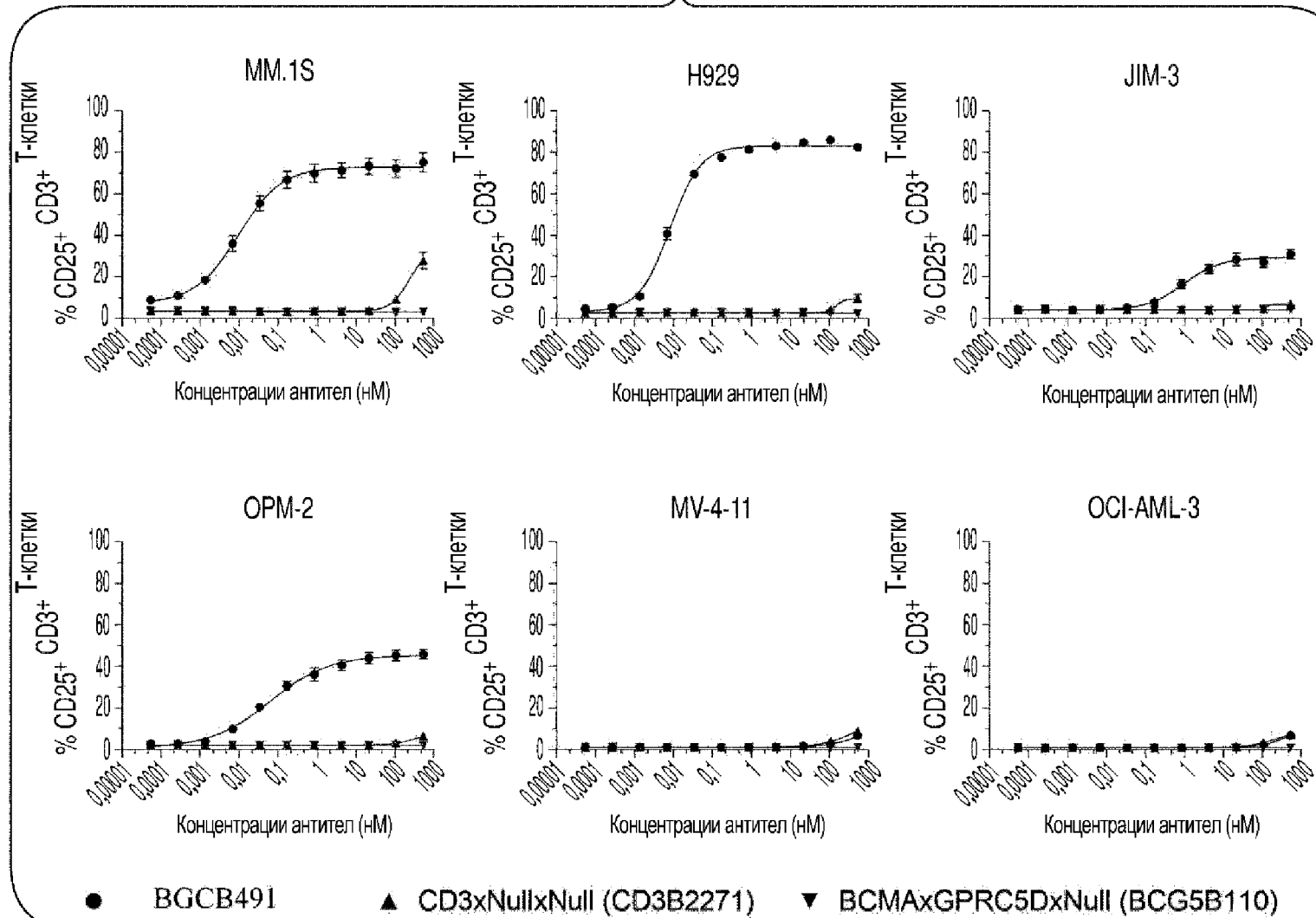
ФИГ. 27



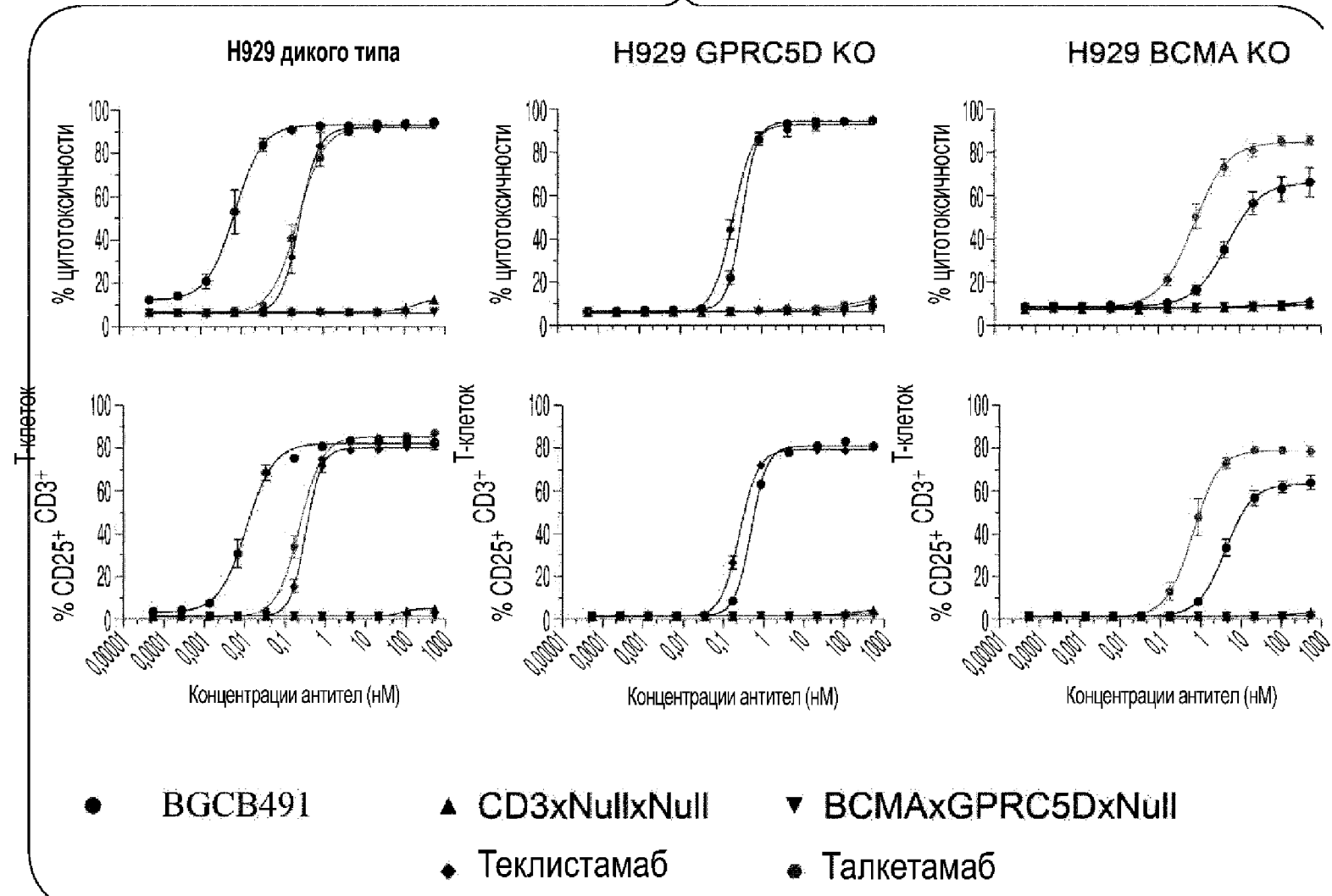
ФИГ. 28А



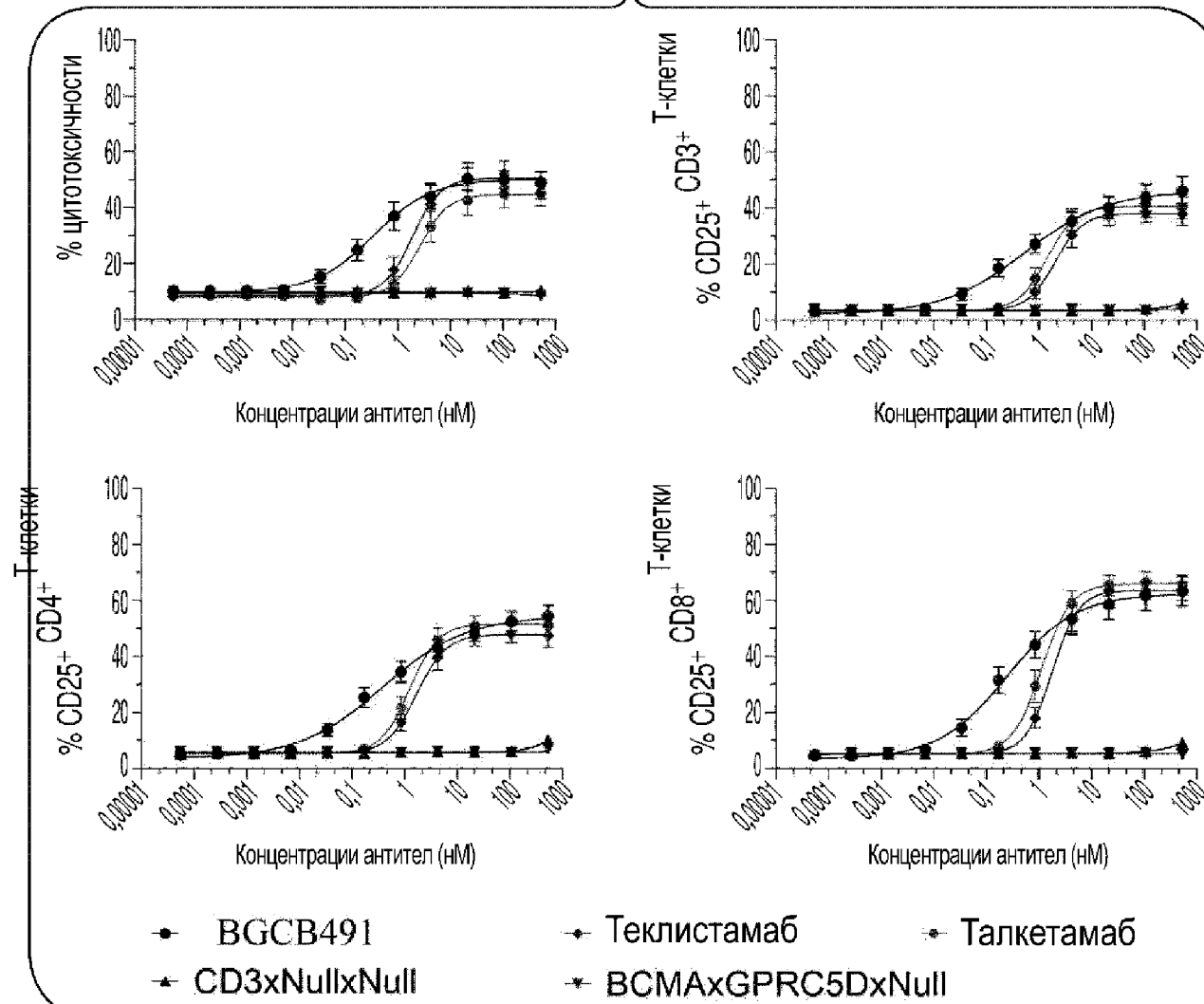
ФИГ. 28Б



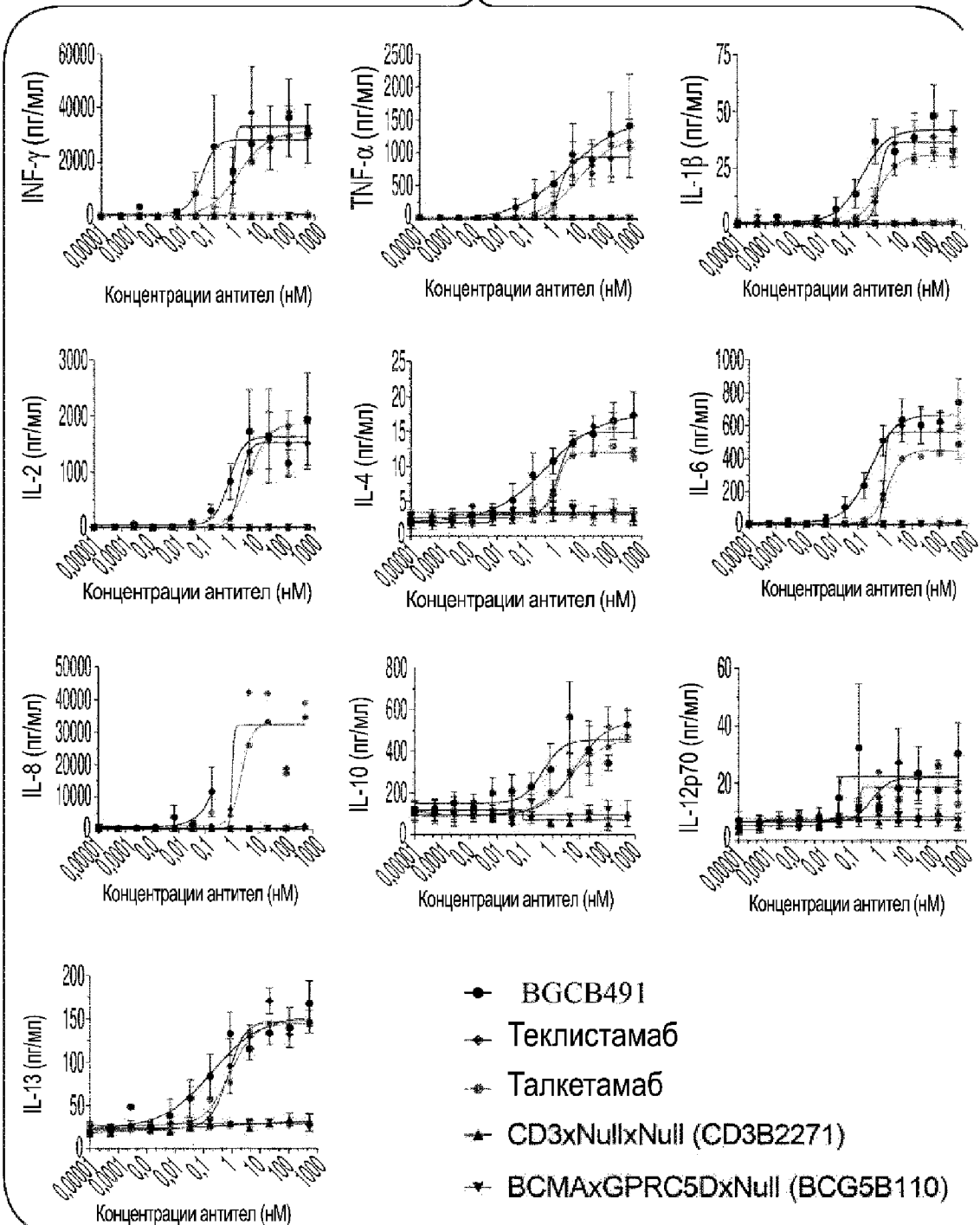
ФИГ. 29



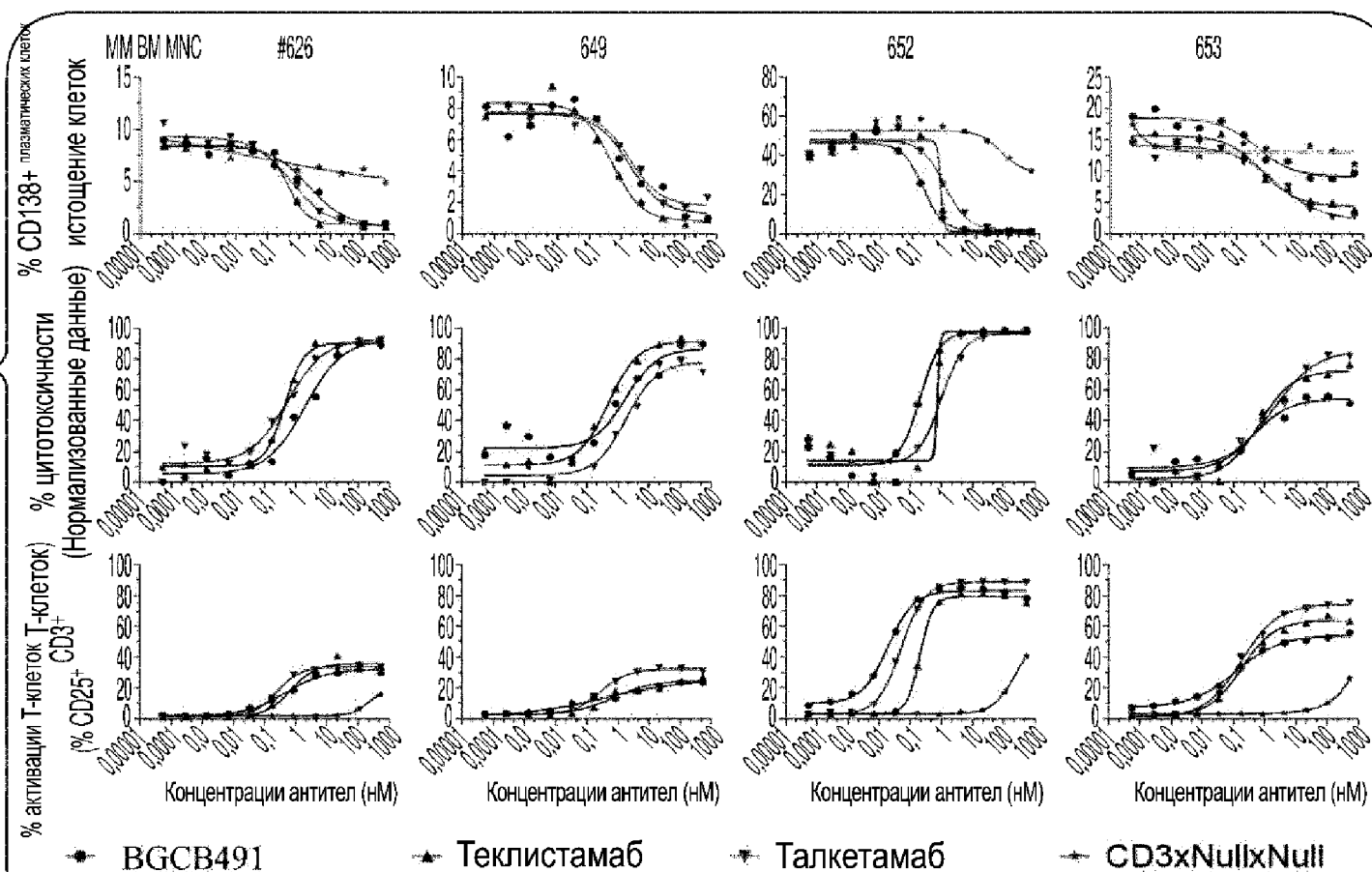
ФИГ. 30



ФИГ. 31

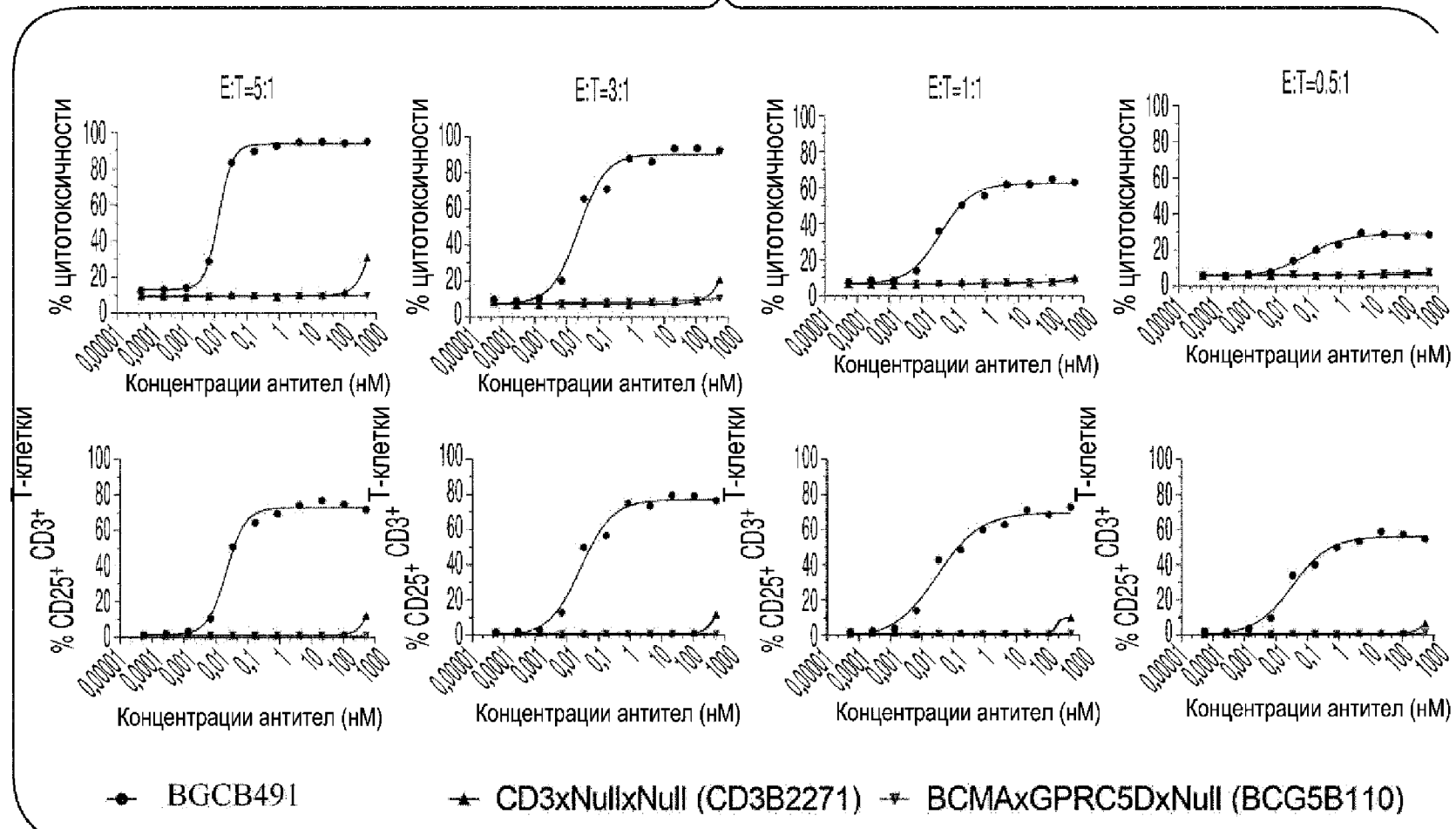


ФИГ. 32

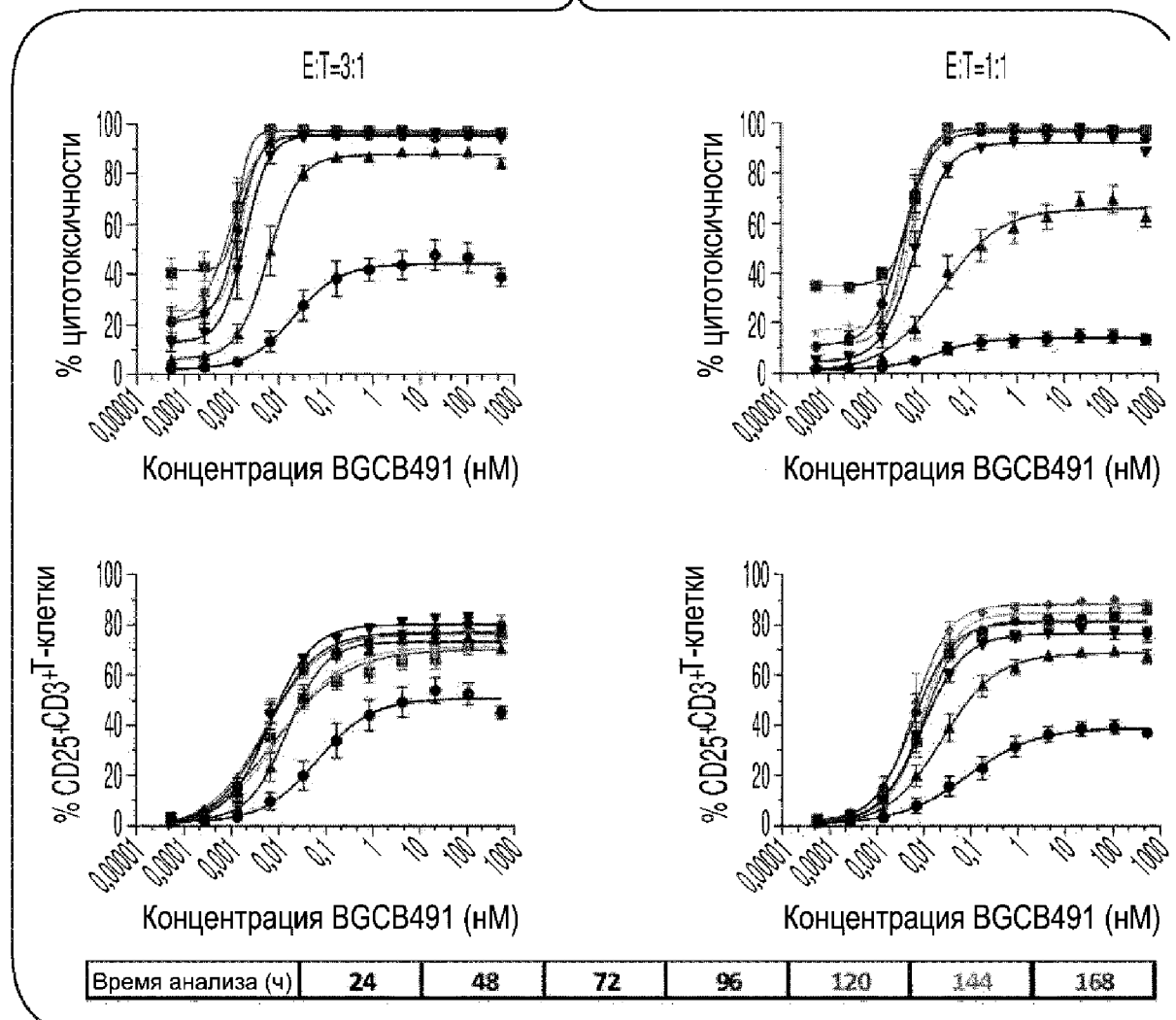


NM BM NC ID №		626	649	652	653
Плотность рецепторов на клетку	BCMA	999	2122	4760	5371
	GPRC5D	2572	3945	8440	4033
% целевой положительной популяции	BCMA	92,8	90,7	99,9	99,7
	GPRC5D	95,4	93,4	99,7	95,6

ФИГ. 33А



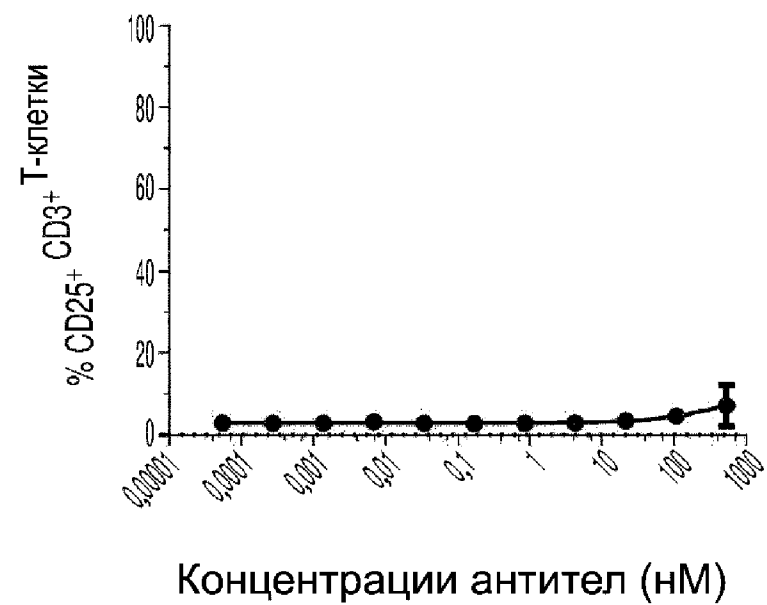
ФИГ. 33Б



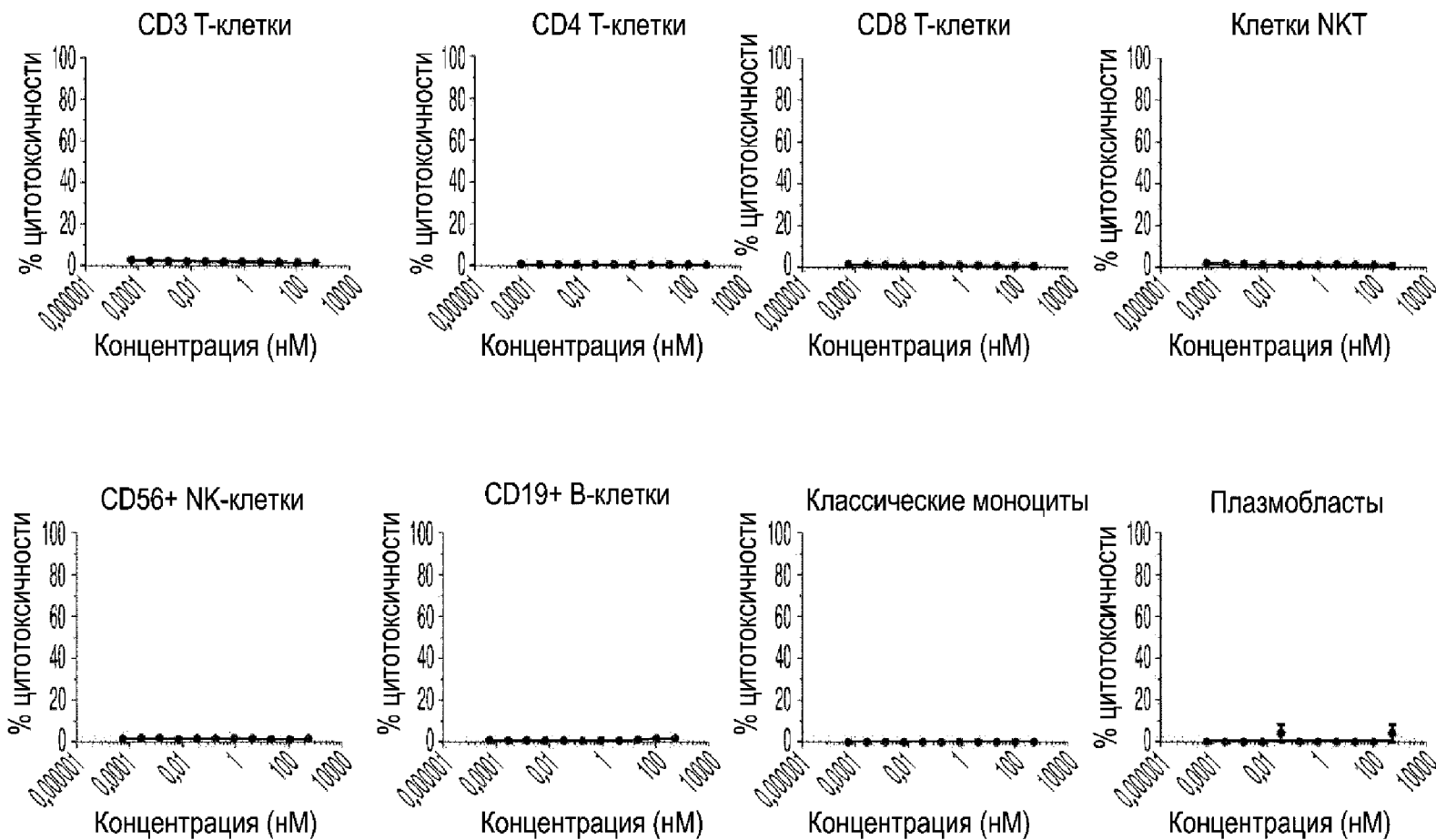
ФИГ. 34А



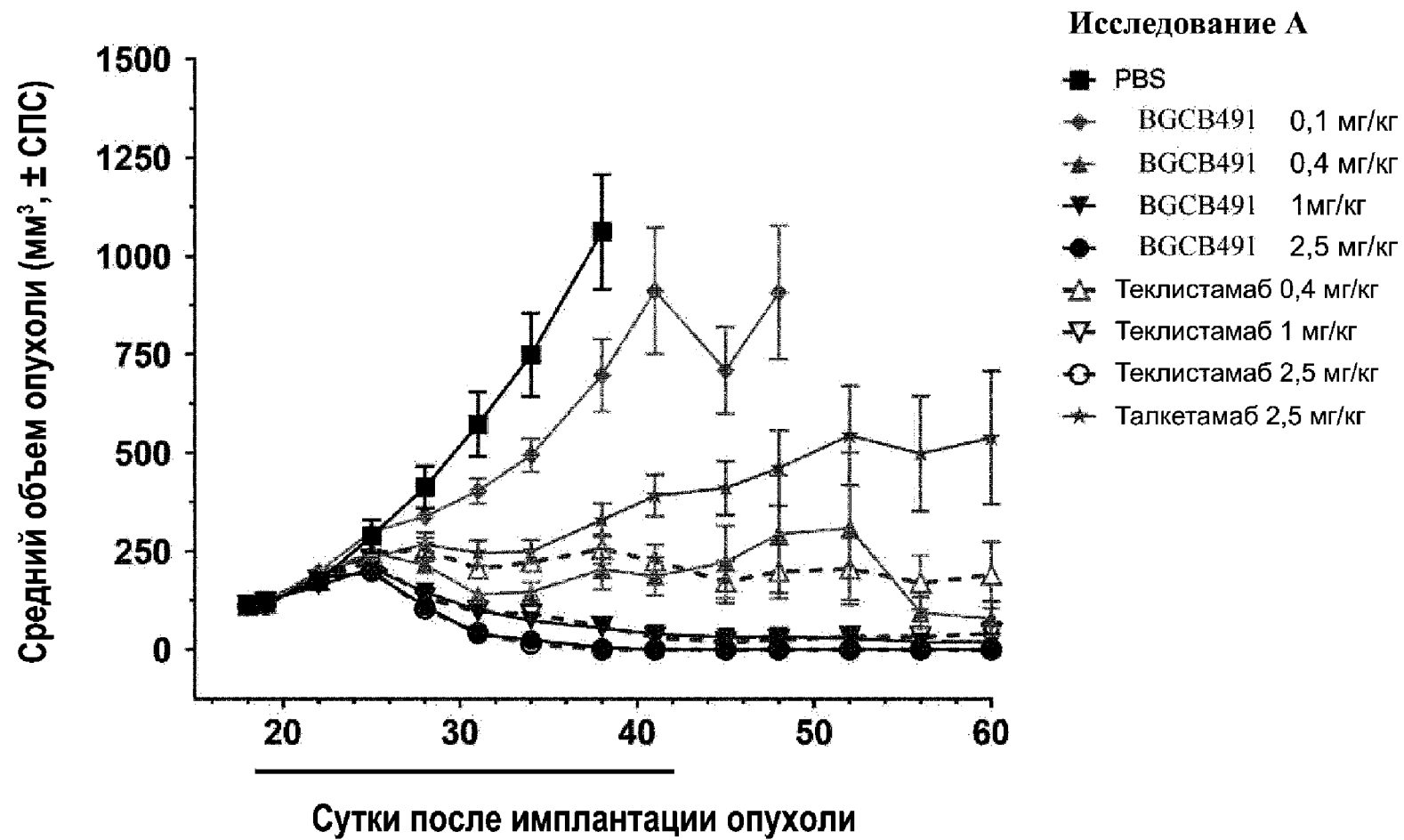
ФИГ. 34Б



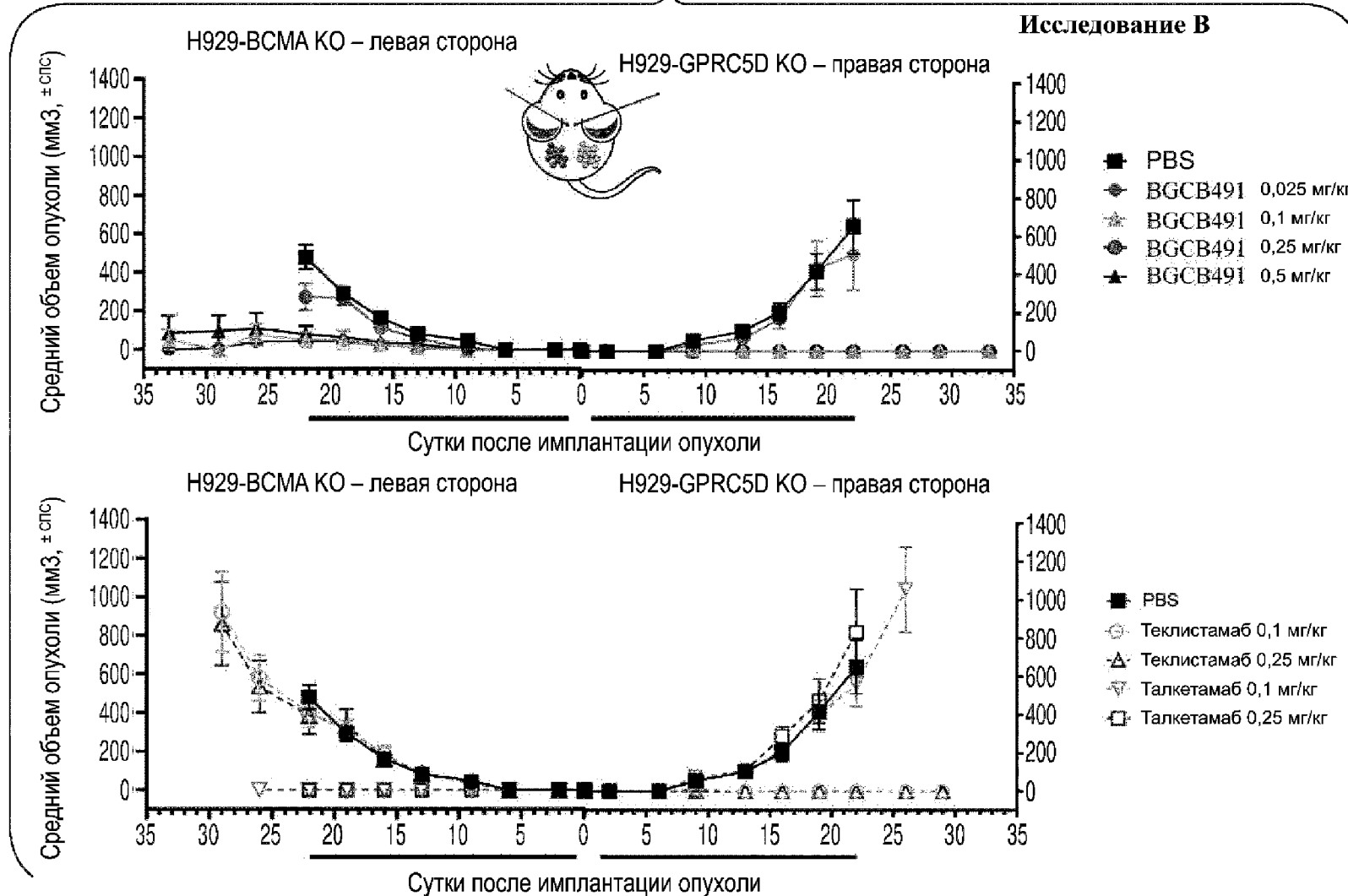
ФИГ. 34В



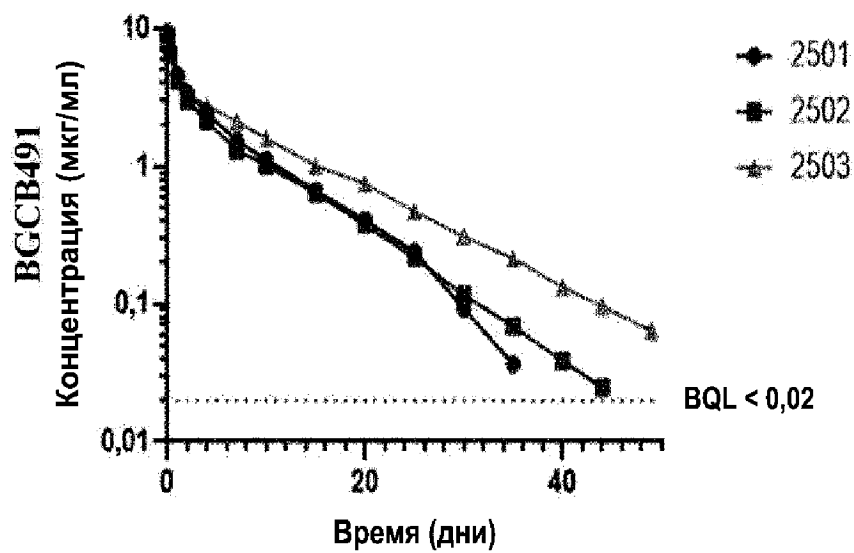
ФИГ. 35



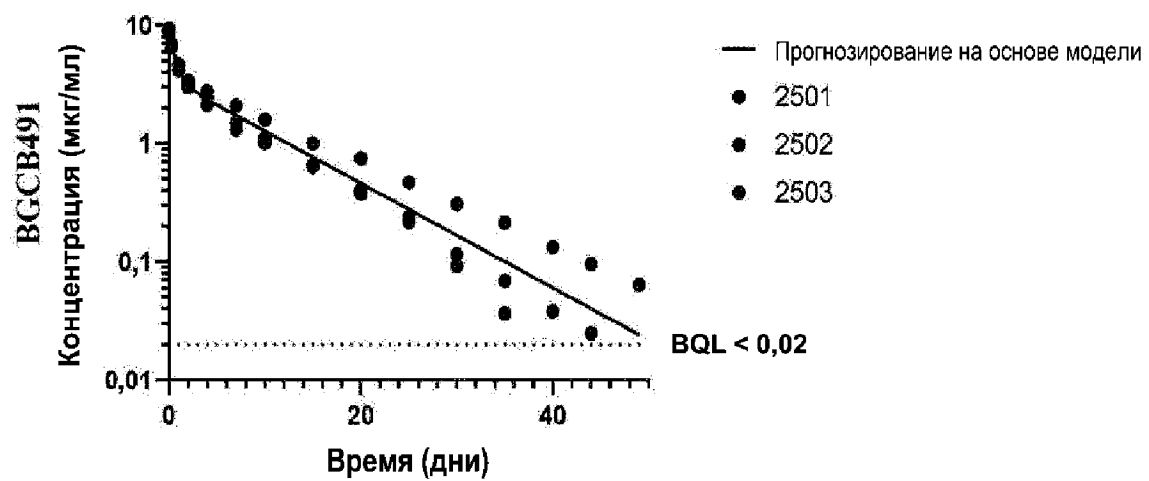
ФИГ. 36



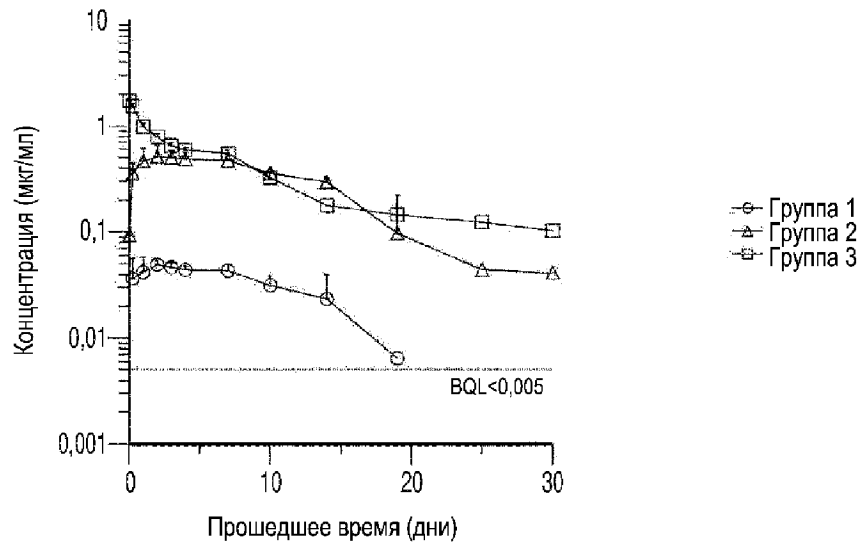
ФИГ. 37



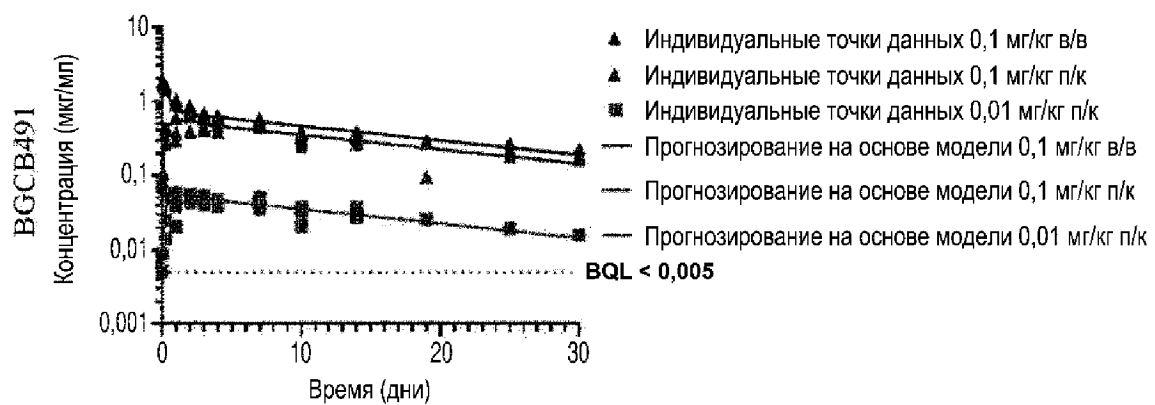
ФИГ. 38



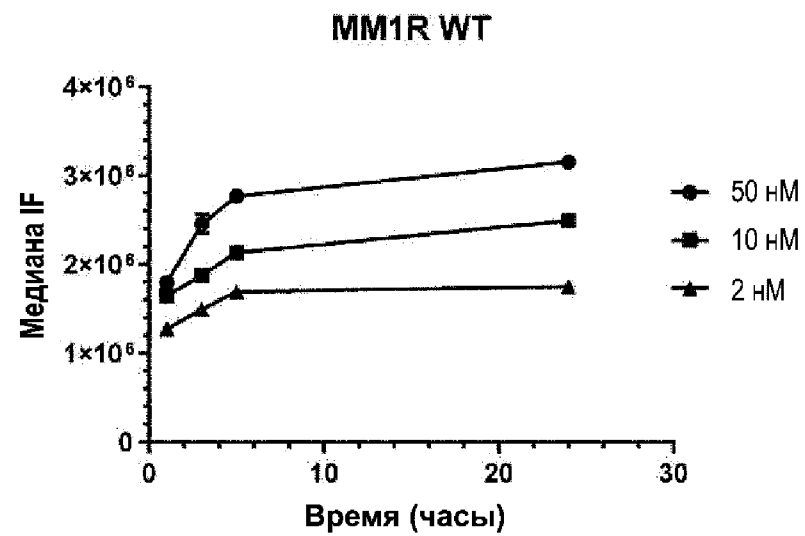
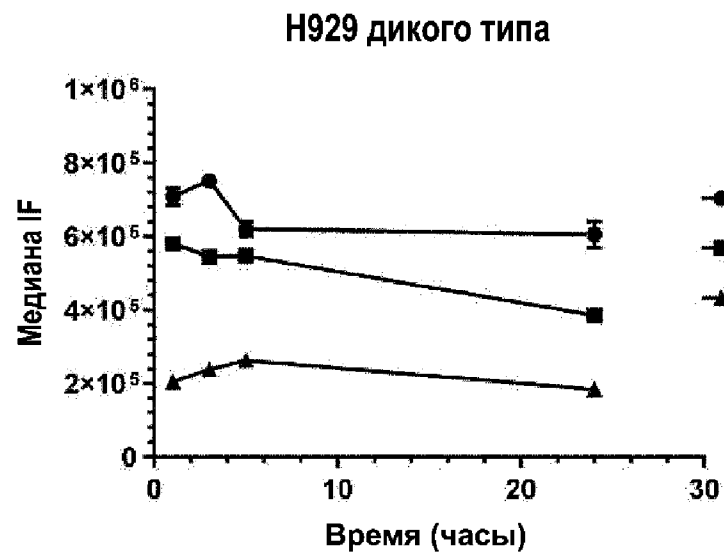
ФИГ. 39А



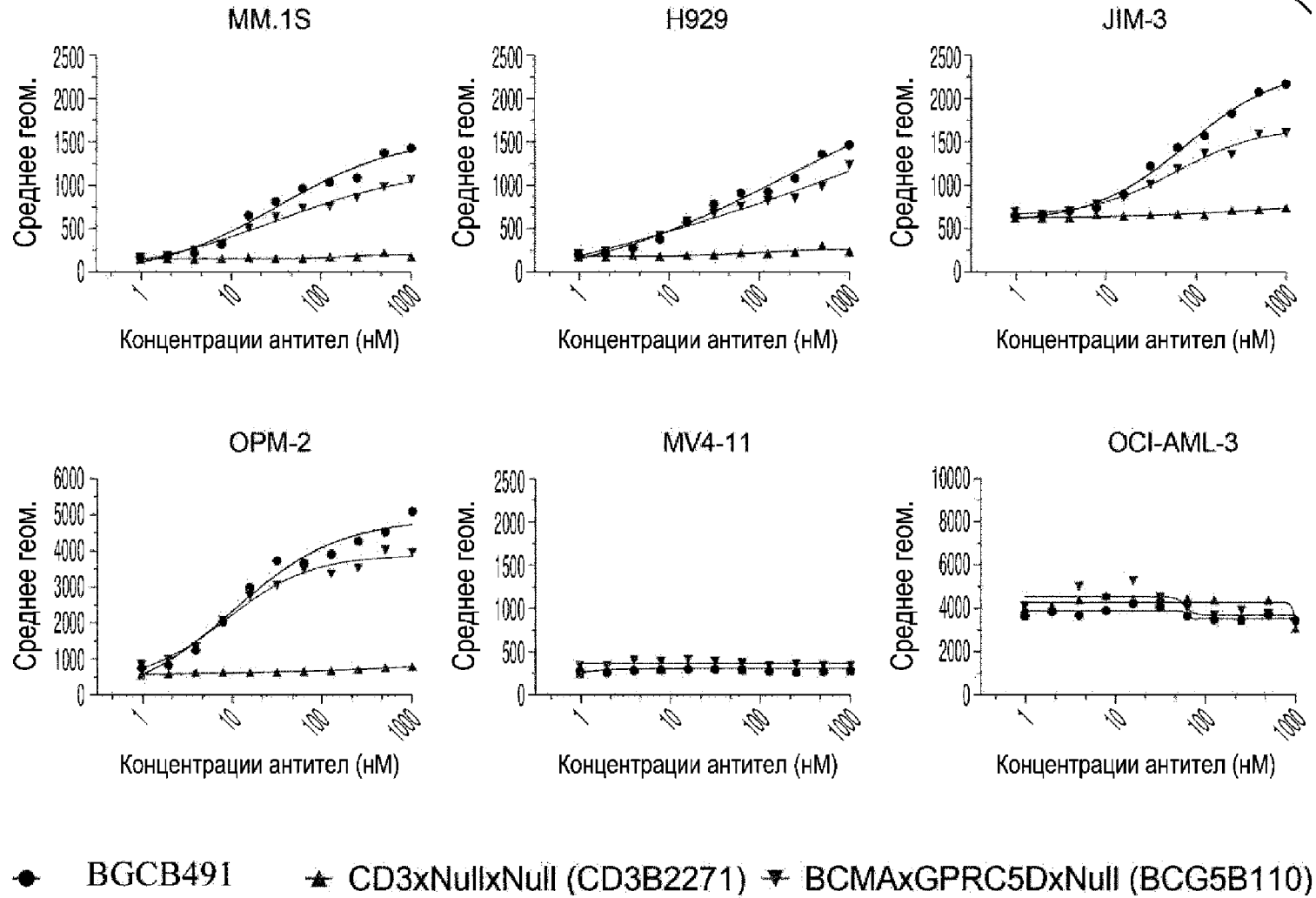
ФИГ. 39Б



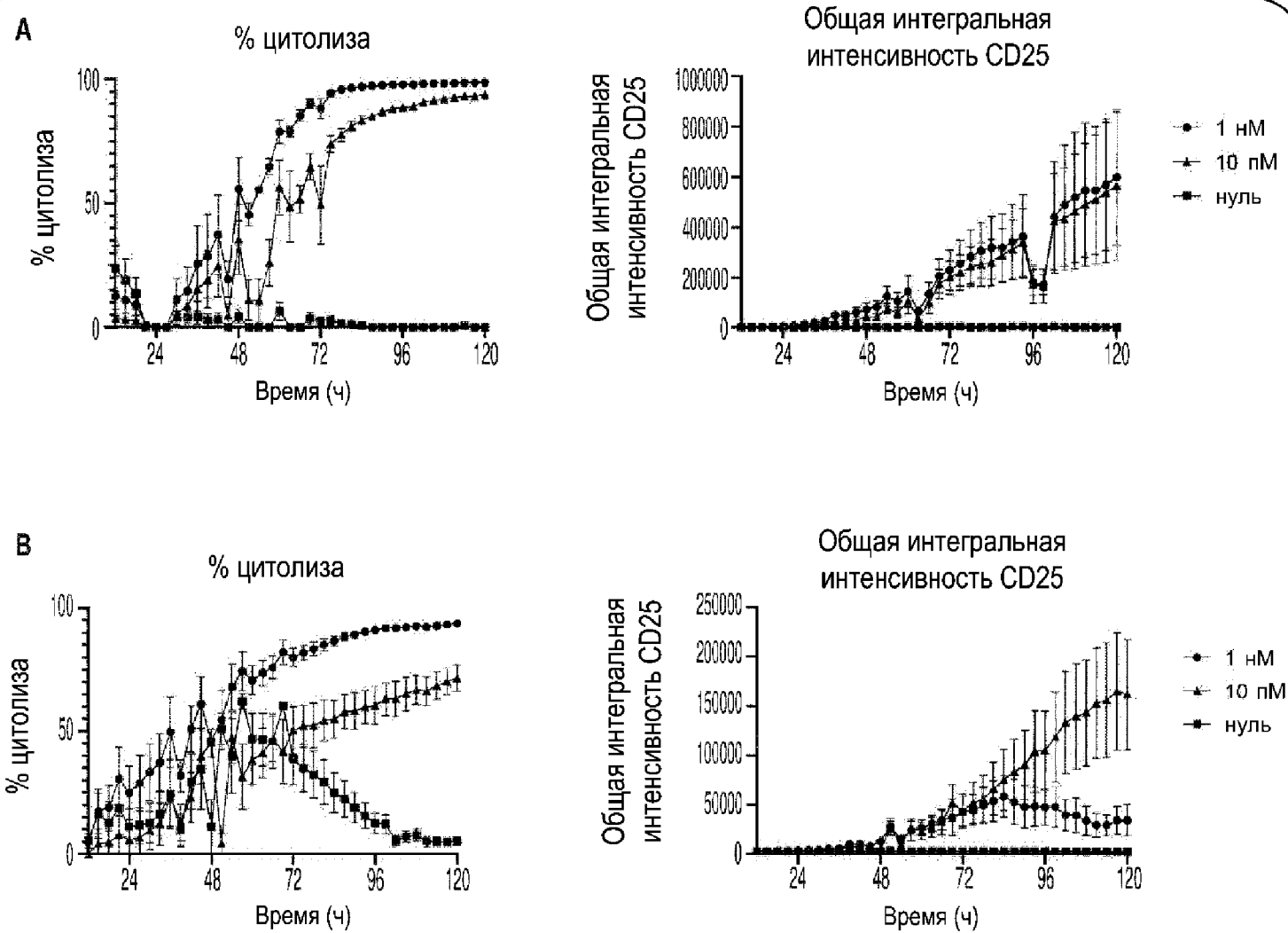
ФИГ. 40



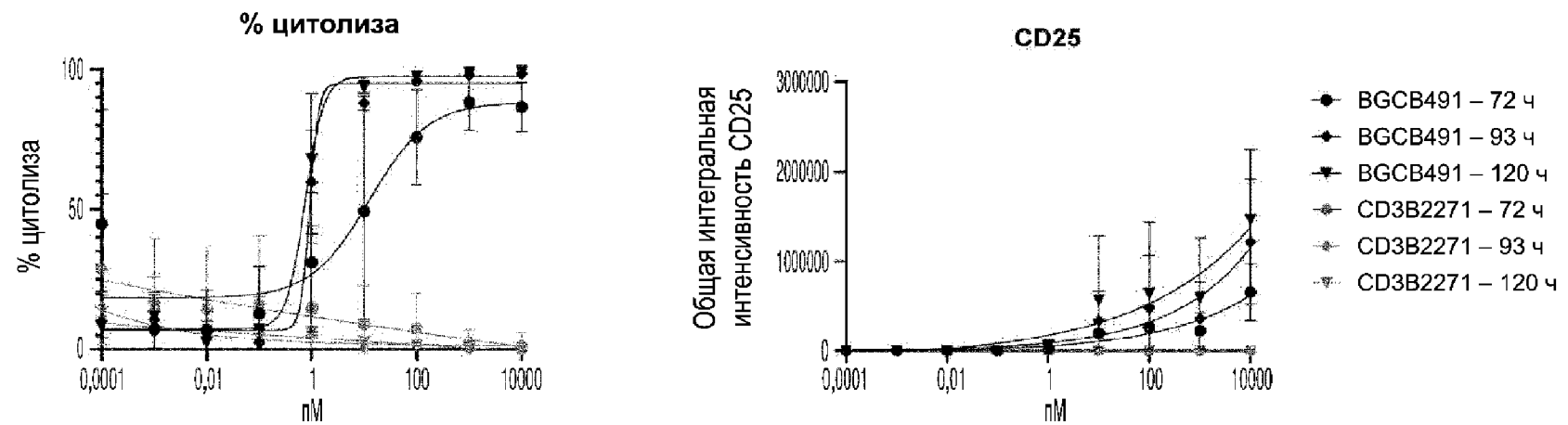
ФИГ. 41



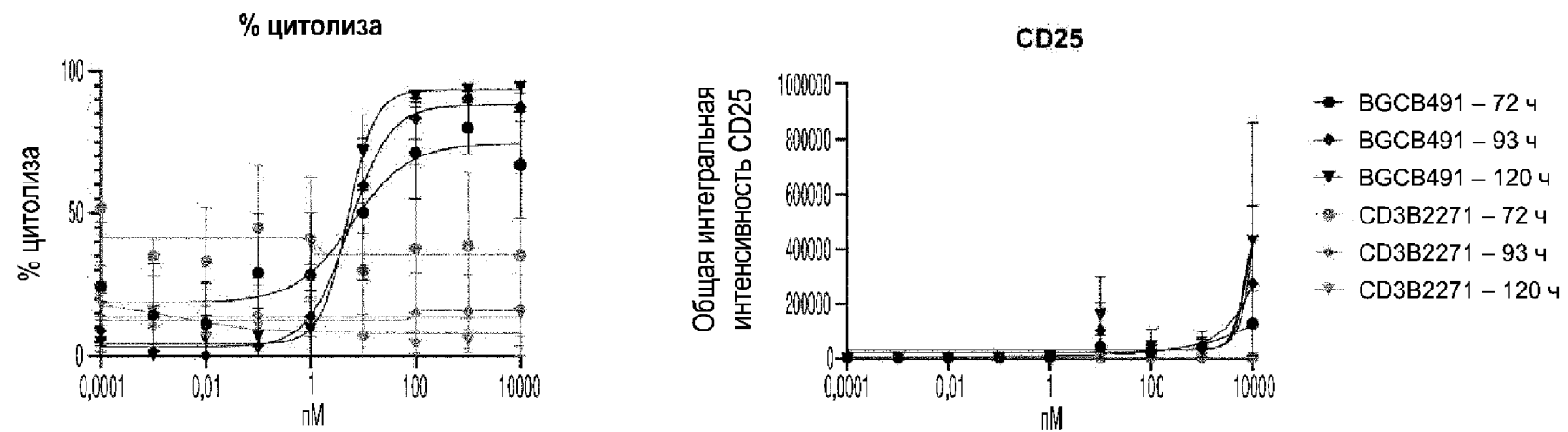
ФИГ. 42



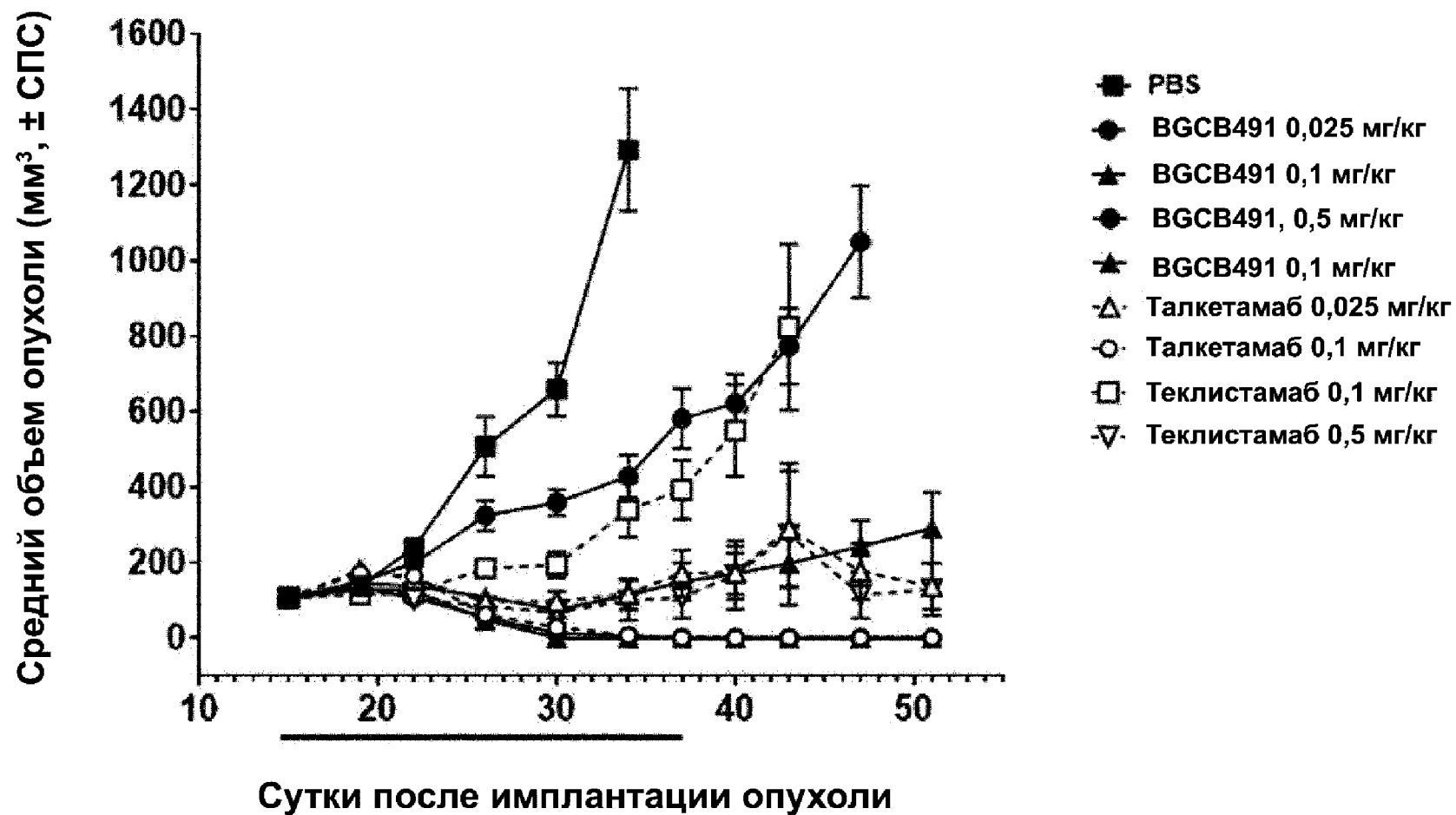
ФИГ. 43



ФИГ. 44



ФИГ. 45



ФИГ. 46А

ID	Описание	Соответствие ScFv	BCMA человека	BCMA яванского макака	H929, 1ч 37C		MM.1R, 1ч 37C	scFv Tm		NSB
		% связывания при 65 °C	KD (M)	KD (M)	EC50 (нМ)	EC90 (нМ)	EC50 (нМ)	EC90 (нМ)	°C	Множественные поверхности
BCMB601	BCMB519_L-H scFv	116%	2.80E-10	N.B	3,2	19	2,3	19	69	Нет

ФИГ. 46Б

ID соединения	Описание	Плечо к CD3	Плечо к BCMA			% гибели опухолевых клеток		
			Клон	Источник	EC50 (нМ)	пМ EC50	Макс. % гибели	пМ EC90
GCDB147	BCMB519 scFv x CDB376 Fab	CD3B376	BCMB519	Ablexis	3,4	115	92	214

ФИГ. 47

ID связующего ве-ва	Клеточное связывание (1 ч при 37 град.)	Кинетическое связывание	Клеточное связывание (1 ч при 37 град.)	Самовзаимо- действие	Самовзаимо- действие	Гидрофобность	NSBscFv Tm	Tm
	EC50(нМ)	(37 град.)	Bmax	Кратность сдвига	(AC-SINS)	(aHIC)	Множественные поверхности	°C
GC5B680 N68S, S69T	6-24	Повышение	++++	Различия отсутствуют	Низкий	Низкий	Низкий	71 (scFv)
GC5B596 (родительское DuoBody 1-го поколен.)	Слабый	Стабильная	Слабый	Не реагирует перекрестно	Высокий	Низкий	Низкий	68 (Tm1)