

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044685**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.22

(21) Номер заявки
201990346

(22) Дата подачи заявки
2017.07.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К GPRC5D, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ GPRC5D И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/364,811**

(32) **2016.07.20**

(33) **US**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/US2017/042982**

(87) **WO 2018/017786 2018.01.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Аттар Рикардо, Чин Диана,
Эдаветгал Сьюзан, Годе Франсуа,
Ли Инчжэ, Луистро Леопольдо,
Маджевски Натан, Мендонка
Марк, Пилларисетти Кондандарам,
Тепляков Алексей, Торнетта Марк
(US)**

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

(56) **WO-A2-2016090329**

WO-A1-2016036937

Anonymous: "Human GPRC5D APC-conjugated Antibody", 12 October 2015 (2015-10-12), XP055408560, Retrieved from the Internet: URL: <https://resources.mdsystems.com/pdfs/datasheets/fab6300a.pdf> [retrieved on 2017-09-21], abstract
RUDIHOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, no. 6, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP002683593, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979, abstract

WO-A2-2005086568

EP-A1-1468694

COHEN YOSSI ET AL.: "GPRC5D is a promising marker for monitoring the tumor load and to target multiple myeloma cells.", HEMATOLOGY (AMSTERDAM, NETHERLANDS) NOV 2013, vol. 18, no. 6, November 2013 (2013-11), pages 348-351, XP009195526, ISSN: 1607-8454, abstract, tables 1-2
JOHANNA ATAMANIUK ET AL.: "Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 42, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 953-960, XP055408451, GB ISSN: 0014-2972, DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02679.x, abstract

(57) В изобретении предлагаются антитела, специфически связывающиеся с GPRC5D. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны способы применения предложенных антител. Например, предложенные антитела можно использовать для диагностики, лечения или контроля прогрессирования, регрессирования или стабильности течения рака с экспрессией GPRC5D; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента или для определения того, поражен ли индивид раковым заболеванием с экспрессией GPRC5D и, следовательно, ответит ли он на лечение GPRC5D-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к GPRC5D и CD3, описанными в настоящем изобретении.

B1**044685****044685 B1**

Перекрестные ссылки на смежные изобретения

Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/364 811, поданной 20 июля 2016 г. Полное содержание упомянутой выше заявки полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 28 июня 2017 г., называется PRD3422USNP_SL.txt и имеет размер 57 673 байт.

Область техники

Изобретение, представленное в настоящем документе, относится к моноклональным антителам, которые специфически связывают сопряженный с G-белком рецептор, класс C, группа 5, член D (GPCR5D), мультиспецифическим антителам, которые специфически связывают GPCR5D и кластер дифференцировки 3 (CD3), и способам продуцирования и применения описанных антител.

Предпосылки создания изобретения

Множественная миелома (ММ) представляет собой вторую по 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 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 настоящее время не лечится.

Сопряженный с G-белком рецептор, класс C, группа 5, член D (GPCR5D) - это сиротский, атипичный GPCR класса C, впервые идентифицированный в 2001 г. (Brauner-Osborne et al. Biochim Biophys Acta. 1518(3):237-248, 2001). GPCR5D и другие GPCR группы 5 имеют необычно короткие аминокотерминальные 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 GPCR5D описаны не были, и лиганд остается неизвестным. Ген имеет три экзона и расположен на хромосоме 12p13.3 у людей. Рецептор GPCR5D является высококонсервативным среди различных видов и имеет 92% идентичность с GPCR5D яванского макака.

mPNC GPCR5D 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 GPCR5D 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).

Такая исключительная экспрессия GPCR5D на линии плазматических клеток указывает на то, что он является идеальной мишенью для противомиеломных антител.

Краткое изложение

В настоящем документе предлагаются антитела, специфически связывающиеся с GPCR5D, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные GPCR5D-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, GPCR5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регрессии или стабильности течения рака с экспрессией GPCR5D; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли индивид раковым заболеванием с экспрессией GPCR5D и, следовательно, ответит ли он на лечение GPCR5D-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к GPCR5D и CD3, описанными в настоящем документе.

Также в настоящем документе предлагаются мультиспецифические антитела, иммуноспецифически связывающиеся с GPCR5D и CD3, а также их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела к GPCR5D×CD3, клетки, экспрессирующие предложенные антитела, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифические антитела. Более того, описаны способы применения предложенных мультиспецифических антител. Например, мультиспецифические антитела к GPCR5D×CD3 можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регрессии или стабильности течения рака с экспрессией GPCR5D; для определения того, следу-

ет ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли индивид раковым заболеванием с экспрессией GPRC5D, и, следовательно, ответит ли он на лечение GPRC5D-специфическим противораковым препаратом, например, мультиспецифическими антителами к GPRC5D×CD3, описанными в настоящем документе.

GPRC5D-специфические антитела

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с GPRC5D человека. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с GPRC5D человека и GPRC5D яванского макака. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с одним или более остатками полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. GPRC5D-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут индуцировать ADCC *in vitro* с концентрацией EC₅₀, составляющей 28 нМ или менее.

В табл. 1 представлена сводная информация о примерах некоторых GPRC5D-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 1. Последовательности CDR моноклональных антител, образованных к человеческому GPRC5D

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (SEQ ID NO 1)	GIIPFGTANYAQ KFQG (SEQ ID NO 5)	ESRWRGYKLD (SEQ ID NO 9)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B465 GC5B597	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSKYYAS SVKG (SEQ ID NO 6)	AAFDGRRAVRL D (SEQ ID NO 10)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B483 GC5B599	SYFIG (SEQ ID NO 3)	IIYPGKSDTRYSP SFQG (SEQ ID NO 7)	VYSFGGRHKALF DY (SEQ ID NO 11)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B596	GYTMN (SEQ ID NO 4)	LINPYNSDTNYAQK LQG (SEQ ID NO 8)	VALRVALDY (SEQ ID NO 12)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNYRYPYT (SEQ ID NO 21)
GC5B382	DYGMH (SEQ ID NO 61)	AIKYSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 67)	RAESGPGLDY (SEQ ID NO 72)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QQYYSTPLT (SEQ ID NO 80)
GC5B379	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSKYYADS VKG (SEQ ID NO 28)	AAWDFGRRAVRL DY (SEQ ID NO 30)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B373	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIYPGKSDTRYSP SFQG (SEQ ID NO 29)	IGFYGRSFRIFD Y (SEQ ID NO 73)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B376	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIYPGKSDTRYSP SFQG (SEQ ID NO 29)	VYSFGGRHKALFD Y (SEQ ID NO 73)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)

			11)			
GC5B385	GYAMS (SEQ ID NO 62)	AISGSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 68)	VDRSFGRSRYTL DY (SEQ ID NO 74)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B370 GC5B598	SYGIS (SEQ ID NO 63)	GIIPIFGNINYAQ KFQG (SEQ ID NO 69)	VSRRFKRFAYF DY (SEQ ID NO 75)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QQYYSTPLT (SEQ ID NO 80)
GC5B602	GYSFTGYTMN (SEQ ID NO 64)	LINPYNGDTN (SEQ ID NO 70)	VALRVALDY (SEQ ID NO 12)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 21)
GC5B603	SYAMS (SEQ ID NO 65)	AISGSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 68)	SNFLPVVFDY (SEQ ID NO 76)	RASQSVRKSLA (SEQ ID NO 95)	TASNRAT (SEQ ID NO 79)	QQYFRAPIT (SEQ ID NO 81)
GC5B601	GFSLTSYNVH (SEQ ID NO 66)	VIWAGGSTNYNSA LMS (SEQ ID NO 71)	DGIRLRFAY (SEQ ID NO 77)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 21)

В некоторых вариантах осуществления предлагается GPRC5D-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается GPRC5D-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, GPRC5D-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с GPRC5D с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1.

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 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 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 изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замену(ы) L234A, L235A и/или K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc. Антитела, описанные в настоящем

документе, могут включать в себя эти модификации.

Наряду с описанными GPRC5D-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие GPRC5D-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 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.

Способы применения GPRC5D-специфических антител

Также описываются способы применения GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Конкретные антитела для применения в способах, описанных в данном разделе, включают таковые, имеющие набор CDR, описанный для антител в табл. 1. Например, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться при лечении рака путем блокировки взаимодействий с рецептором GPRC5D или, когда антитело конъюгируют с токсином, направляя токсин к раку с экспрессией GPRC5D. Кроме того, данные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для обнаружения наличия GPRC5D в биологическом образце, например в крови или сыворотке; для количественного определения GPRC5D в биологическом образце, например в крови или сыворотке; для диагностики рака с экспрессией GPRC5D; определения способа лечения индивида, пораженного раком; или контроля прогрессирования рака с экспрессией GPRC5D у индивида. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D может представлять собой лимфому, такую как множественная миелома (ММ). Описанные способы можно осуществлять до того, как индивид получит лечение по поводу рака с экспрессией GPRC5D, например лечение мультиспецифическим антителом к GPRC5D и CD3. Кроме того, описанные способы можно осуществлять после того, как индивид получит лечение по поводу рака с экспрессией GPRC5D, например лечение мультиспецифическим антителом к GPRC5D и CD3, описанным в настоящем документе.

Описанные способы обнаружения GPRC5D в биологическом образце включают воздействие на биологический образец одним или более из GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

Описанные способы диагностирования рака с экспрессией GPRC5D у индивида также включают воздействие на биологический образец одним или более из GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; однако способы также включают определение количества GPRC5D, присутствующего в образце; сравнение количества GPRC5D, присутствующего в образце, с известным стандартным или эталонным образцом; и определение того, попадают ли уровни GPRC5D индивида в пределы уровней GPRC5D, связанных с раком.

Также в настоящем документе описаны способы контроля рака с экспрессией GPRC5D у индивида. Описанные способы включают воздействие на биологический образец одним или более из GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; определение количества GPRC5D, присутствующего в образце, и связавшегося с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; сравнение количества GPRC5D, присутствующего в образце, либо с известным стандартным или эталонным образцом, либо с количеством GPRC5D в подобном образце, полученном от индивида ранее; и определение того, являются ли уровни GPRC5D у индивида показателями прогрессирования, регрессирования или стабильного течения заболевания на основании разницы количества GPRC5D в сравниваемых образцах.

Пробы, полученные от индивидов, 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 тонкоигольной аспирационной биопсии или гистологические препараты.

Описанные GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно метить 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 GPRC5D-специфических антител

В настоящем документе описываются наборы, включающие описанные GPRC5D-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения GPRC5D-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 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении наличия GPRC5D в биологическом образце. 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.

Мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3

Перенаправление Т-лимфоцитов к ММ-клеткам, экспрессирующим GPRC5D, посредством комплекса TCR/CD3 представляет собой привлекательный альтернативный подход. Комплекс Т-лимфоцитов TCR/CD3 состоит из гетеродимера TCR альфа (α)/бета (β) или TCR гамма (γ)/дельта (δ), экспрессируемого на клеточной поверхности совместно с константными субъединицами CD3, обозначаемыми как гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), зета (ζ) и эта (η). Человеческий CD3 ϵ описан как UniProt P07766 (CD3E_HUMAN).

Антитело к CD3 ϵ , 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. WO 2000041474). 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 распознает эпитоп, состоящий из ϵ - и γ -цепей. Последовательность антитела, идентичная последовательности антитела SP34, описана в WO 2008119565, WO 2008119566, WO 2008119567, WO 2010037836, WO 2010037837 и WO 2010037838. Последовательность, на 96% идентичная VH антитела SP34, описана в US 8236308 (WO 2007042261).

В настоящем документе описаны выделенные мультиспецифические антитела, связывающиеся с GPRC5D и CD3 ("мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3") и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфическое плечо мультиспецифического антитела связывает человеческий GPRC5D и GPRC5D яванского макака. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфическое плечо мультиспецифических антител к GPRC5D×CD3 или антигенсвязывающих фрагментов связывается с внеклеточным доменом GPRC5D человека. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, содержащее: а) первую тяжелую цепь (HC1); б) вторую тяжелую цепь (HC2); в) первую легкую цепь (LC1) и д) вторую легкую цепь (LC2), причем HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывает GPRC5D, а HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывает CD3; или его биспецифический фрагмент, связывающий GPRC5D×CD3. В другом варианте осуществления предлагается выделенная клетка, экспрессирующая антитело или биспецифический связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо (или "GPRC5D-специфическое плечо") мультиспецифического антитела к GPRC5D×CD3 получено из антитела к GPRC5D, описанного в настоящем документе (например, из антитела, имеющего последовательности CDR, перечисленные в табл. 1).

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфическое плечо мультиспецифических антител к GPRC5D×CD3 или антигенсвязывающих фрагментов представляет собой IgG или его производные. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо (или "CD3-специфическое плечо") мультиспецифического антитела к GPRC5D×CD3 получено из мышинового 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 GPRC5D×CD3 содержит один домен VH и один домен VL, выбранные из табл. 2.

Таблица 2. Тяжелые цепи и легкие цепи CD3-специфического антитела и антигенсвязывающего фрагмента

VH	VL
CD3B219 (SEQ ID NO:99):	CD3B219 (SEQ ID NO:100):
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSN
TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT	YANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSG
YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKT	SLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV
EDTAVYYCARHGNFNGSYVSWFAYWGQGTL	FGGGKTLTVLGGQKAAPSVTLFPPSSEELQANK
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL	ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA	TPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQV
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV	THEGSTVEKTVAPTECS
DHKPSTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA	
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD	
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ	
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN	
KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQ	
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG	
QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS	
RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSL	
GK	

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.

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.

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 CD3-специфического 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 F405L. 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 CD3s 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 GPRC5D×CD3, также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические анти-

тела к GPRC5D×CD3. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента. В настоящем документе также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3. 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. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы получения биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента путем культивирования клеток.

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

Способы применения мультиспецифических антител к GPRC5D×CD3

Также описываются способы применения мультиспецифических антител к GPRC5D×CD3 или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов. Например, мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией GPRC5D у индивида, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D представляет собой лимфому, такую как множественная миелома.

Описанные способы лечения рака с экспрессией GPRC5D у нуждающегося в таком лечении индивида включают введение индивиду терапевтически эффективного количества описанного мультиспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления индивид является млекопитающим, предпочтительно человеком. В предпочтительных вариантах осуществления предлагаются способы лечения индивида, пораженного раком, путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического антигенсвязывающего фрагмента нуждающемуся в таком лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

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

Также в настоящем документе предлагаются способы перенаправления Т-клетки к экспрессирующей GPRC5D раковой клетке путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

Наборы с GPRC5D×CD3-специфическим антителом

В настоящем документе описываются наборы, содержащие описанные мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения мультиспецифических антител к GPRC5D×CD3, предложенных в настоящем документе, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать антитела, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для лечения рака с экспрессией GPRC5D. 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.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Зависимый от концентрации профиль связывания выбранных моноклональных антител (mAb) к GPRC5D относительно клеток HEK293 с GPRC5D человека и таких же нетрансфицированных клеток. Также наблюдали, что три mAb GC5B36, GC5B168 и GC5B205 связываются с нетрансфицированными (GPRC5D-нулевыми) клетками HEK293.

Фиг. 2: Дозозависимое связывание биспецифических антител к GPCR5D×CD3 с клетками HEK293F с GPRC5D человека.

Фиг. 3: Профиль связывания биспецифических антител на клетках MM1R и H929 сравнивали со сверхэкспрессирующими GPCR5D человека клетками HEK293 и нетрансфицированными клетками HEK293 с помощью FACS.

Фиг. 4A и 4B: Опосредованная Т-клетками цитотоксичность и активация Т-клеток антител к GPCR5D×CD3 относительно клеток, экспрессирующих человеческий GPRC5D.

Фиг. 5A и 5B: Опосредованная Т-клетками цитотоксичность и активация Т-клеток антител к

GPRC5D×CD3 относительно клеток, экспрессирующих GPRC5D яванского макака.

Фиг. 6A и 6B: Антитела к GPRC5D×CD3 эффективно уничтожают клетки H929 в профилактической модели мышей NSG. GCDB32 (6A) и GCDB35 (6B) вызвали полное ингибирование роста опухоли при использовании доз 10 мкг, при этом GCDB32 также способен на 100% ингибировать рост опухоли при использовании дозы 1 мкг.

Фиг. 7A и 7B: Сравнение активности в отсутствие (7A) и в присутствии (7B) Fc-блока.

Фиг. 8A-8D: Связывание GCDB32, GCDB35, GCDB40 и GCDB43 с рецепторами Fcγ.

Фиг. 9A и 9B: Оценка связывания полученных из гибридомы mAb с помощью FACS.

Фиг. 10A и 10B: Опосредованная T-клетками цитотоксичность биспецифических антител к GPRC5D×CD3 против клеток H929.

Фиг. 11A-11E: Связывание биспецифических антител к GPRC5D×CD3 с клеточными линиями, положительными (H929, MM1R, LP1, OPM2) и отрицательными (NALM6) к GPRC5D.

Фиг. 12A-12D: Биспецифические антитела к GPRC5D×CD3 являются мощными ингибиторами опухоли *in vivo*. Все биспецифические антитела к GPRC5D×CD3 (GCDB32, показанное на 12A, GCDB53, показанное на 12B, GCDB61, показанное на 12C, и GCDB72, показанное на 12D) полностью ингибировали рост опухолевых клеток множественной миеломы (H929) при использовании доз 10 и 1 мкг. Дифференцировку наблюдали при использовании дозы 0,1 мкг, при этом наблюдали, что GCDB72 демонстрировало 80% ингибирование роста опухоли.

Фиг. 13: Клеточные линии GPRC5D⁺ MM1.R окрашивали в течение 60 мин различными концентрациями лидерных антител для измерения поверхностных профилей связывания (n=3). Меченный фикоэритрином человеческий IgG4Fc использовали в качестве вторичного антитела для захвата сигнала (Southern Biotech, клон HP6025). Связывание выражается как нормализованное среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции, измеренное методом FACS. Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра) и подбора методом наименьших квадратов.

Фиг. 14A и 14B: Клеточные линии GPRC5D⁺ окрашивали в течение 60 мин с различными концентрациями антител FAB6300 и GC5M481 для измерения поверхностных профилей связывания. Меченный фикоэритрином человеческий IgG4Fc использовали в качестве вторичного антитела для захвата сигнала (Southern Biotech, клон HP6025). Связывание выражается в виде гистограмм (черная линия обозначает изотип, а красная линия обозначает специфическое к GPRC5D антитело (фиг. 14A)). На фиг. 14B показан профиль связывания лидерных молекул на GPRC5D⁺ клеточных линиях множественной миеломы. Затененная область, ограниченная пунктирной линией обозначает изотипический контроль, а сплошная линия обозначает связывание лидерной молекулы.

Фиг. 15A и 15B: Замороженные мононуклеарные клетки костномозгового происхождения, полученные от двух разных пациентов с MM, использовали для оценки связывания биспецифических антител к GPRC5D×CD3 по сравнению с изотипическим контролем IgG4, цитотоксичностью плазматических клеток и активацией T-клеток. Для анализа цитотоксичности T-клетки нормального здорового донора экзогенно добавили к образцам МНК-КМ пациента и инкубировали с четырьмя лидерными молекулами в течение 48 ч. Во всех пробах донора биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 связывается с плазматическими клетками дозозависимым образом, и по оси Y фиксировали значения средней интенсивности флуоресценции. Отмечали уменьшение живых плазматических клеток (CD138⁺) и сопутствующее увеличение экспрессии CD25 на T-клетках в ответ на обработку биспецифическим антителом к GPRC5D×CD3.

Фиг. 16: Мышам NSG подкожно имплантировали человеческие клетки множественной миеломы MM.1S в день 0. Человеческие МКПК внутривенно инокулировали на день исследования 7. ФСБ, GCDB72 (0,1 мкг, 1 мкг, 10 мкг и 50 мкг/животное (эквивалентно 0,005; 0,05; 0,5 и 2,5 мг/кг, соответственно)) и контрольные антитела нулевого плеча внутривенно вводили в дни 15, 18, 22, 24, 29, 32 и 36. Подкожные опухоли измеряли два раза в неделю, а результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм³ ± СПС для каждой группы. Обработка антителом GCDB72 в дозе 1 мкг (0,05 мг/кг) значительно ингибировала рост подкожной опухоли по сравнению с ФСБ (TGI = 64%, p ≤ 0,0001). Дозы GCDB72 10 мкг/животное (0,5 мг/кг) и 50 мкг/животное (2,5 мг/кг) полностью регрессировали рост опухоли (p ≤ 0,0001). Контрольные антитела нулевого плеча оказывали пренебрежимо малое воздействие или не оказывали никакого воздействия. Статистическую значимость определяли с помощью 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с множественными сравнениями с использованием критерия множественного сравнения Тьюки с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism (версия 6). Различия между группами считались значимыми, когда значение вероятности (p) составляло ≤ 0,05.

Фиг. 17: Мышам NSG подкожно имплантировали человеческие клетки множественной миеломы MM.1S в день 0. Человеческие МКПК внутривенно инокулировали на день исследования 7. ФСБ, GCDB72 (0,1 мкг, 1 мкг, 10 мкг и 50 мкг/животное (эквивалентно 0,005; 0,05; 0,5 и 2,5 мг/кг, соответственно)) и контрольные антитела нулевого плеча внутривенно вводили в дни 15, 18, 22, 24, 29, 32 и 36. Масса тела представлена в виде абсолютной массы тела от начала лечения до конца исследования.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления Определения

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

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 в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

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". 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 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.

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 путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. При использовании в настоящем документе термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, по существу не содержащий других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с GPRC5D, по существу не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от GPRC5D). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом GPRC5D, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, от других видов (таких как видовые гомологи 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 в себя 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 в себя, 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 метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно 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 коди-

рующих 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 \times 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 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 PAM120 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 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 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 GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, основу или 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 последовательностями, описанными в настоящем документе. "Вектор" представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космоид или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

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, 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.

Термин "лечение" относится к любому успеху или признаку успеха в ослаблении или облегчении симптомов травмы, патологии или состояния, включая любые объективные или индивидуальные параметры, такие как ослабление боли, ремиссия, ослабление симптомов или перевод состояния в легче переносимую 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 индивидуальным параметрам, включая результаты объективного обследования, неврологического осмотра или психиатрической экспертизы.

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 GPRC5D×CD3 может 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 перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

"Антителом" называются все изоформы 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.

"Антигенсвязывающие фрагменты" представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. 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 исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (вариабельную 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 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, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), 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. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изоформы 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 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.

Термины "CDR" и множественное число для "CDR" относятся к определяющей комплементарности области (CDR), при этом три такие области определяют связывающий характер переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), и три определяют связывающий характер переменной 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 можно различать с помощью нумераций по системе Kabat, Chothia, контактными или любым другим граничным определениям. Несмотря на различные границы, каждая из таких систем отличается определенной степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемую "гиперпеременную область" в пределах переменных 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 переменной 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.

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} M, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. Такие фразы, как "[антиген]-специфическое" антитело (например, GPRC5D-специфическое антитело) означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

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, либо 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 в себя 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 в себя, 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 метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно 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.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плазида, фаг, космида 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.

Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток. 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 ва-

риаций 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 × 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 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 PAM120 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 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 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 GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, остов или 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 последовательностями, описанными в настоящем документе.

Термин "индивид" 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 индивид представляет собой человека.

Используемый в настоящем документе термин "перенаправлять" или "перенаправление" относится к способности антитела к GPRC5D×CD3 эффективно направлять активность Т-клеток от присущей им родственной специфичности к реактивности против клеток, экспрессирующих GPRC5D.

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 индивида, а также текучие среды, клетки или ткани, находящиеся внутри тела индивида. 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 индивида 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 индивида 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

индивидом или биологическим источником, например среду для культивирования клеток или органов, в том числе среду, кондиционированную клетками или органами, промывные текучие среды и т.п. В контексте настоящего документа термин "проба" охватывает материалы, извлеченные из организма индивида, или материалы, находящиеся в организме индивида.

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

Используемые в настоящем документе термины "сопряженный с G-белком 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).

Термин CD3 относится к человеческому белковому комплексу CD3, состоящему из множества субъединиц. 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 GPRC5D \times CD3" представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно, биспецифическое антитело, которое содержит две разных антигенсвязывающих области, одна из которых специфически связывается с антигеном GPRC5D, а другая специфически связывается с CD3.

Мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое антитело, диатело или сходную молекулу (см., например, публикацию PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993), в которой приведено описание диател). Биспецифические молекулы, диатела и т.п., предложенные в настоящем документе, могут связываться с любой приемлемой мишенью в дополнение к части GPRC5D. Термин "биспецифическое антитело" следует понимать как антитело, имеющее две разные антигенсвязывающие области, определяемые разными последовательностями антитела. Это можно понимать как связывание с разными мишенями, но также сюда входит связывание с разными эпитопами на одной мишени.

"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, эталонный образец можно использовать как опорное значение концентраций GPRC5D, которые служат показателем наличия рака у индивида. Эталонный образец не обязательно следует анализировать параллельно с исследуемым образцом, следовательно, в некоторых случаях эталонный образец может представлять собой ранее определенное числовое значение или диапазон, характеризующий данное состояние, например уровни GPRC5D, которые служат показателями наличия рака у индивида. Термин также включает в себя образцы, используемые для сравнительных целей, и которые по имеющимся данным связаны с физиологическим состоянием или состоянием заболевания, например, раком с экспрессией GPRC5D, но имеющие неизвестное количество GPRC5D.

Термин "прогрессировать" при использовании в контексте прогрессирования рака с экспрессией GPRC5D 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 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 "регрессирование" при использовании в контексте регрессирования рака с экспрессией GPRC5D 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.

Термин "стабильный" при использовании в контексте стабильного рака с экспрессией GPRC5D описывает состояние заболевания, которое не изменяется или не изменилось существенно в течение клинически значимого периода времени, чтобы его можно было считать прогрессирующим или регресси-

рующим раком.

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

GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты

В настоящем документе описываются выделенные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с GPRC5D. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

К описанным GPRC5D-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.

GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида, используя рекомбинантные методы. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышьиные, крысиные, козы, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, 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 табл. 1.

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается GPRC5D-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается GPRC5D-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19. Это GPRC5D-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать человеческие каркасные последователь-

щую SEQ ID NO: 71, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 66, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 71, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 77, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21. Это GPRC5D-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать человеческие каркасные последовательности. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 91, и переменный домен легкой цепи, по существу такой же или идентичный SEQ ID NO: 94. Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антител, описанных в настоящем абзаце, являются приемлемыми для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела к GPRC5D.

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 область Fc IgG1 (SEQ ID NO. 60).

SEQ ID NO. 60

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSLVTLVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc (SEQ ID NO: 59).

SEQ	ID	NO.	59
ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSLVTLVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK			

Специфические антитела, определяющиеся последовательностями CDR и/или переменных доменов, описанными в абзацах выше, могут включать в себя эти модификации.

Также описываются выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с GPRC5D. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты переменных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов. Пример полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело GPRC5D, представлен ниже:

Последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:96):

atggcctgggtctggaccctgctgtcctgatggccgctgccagagcatccaggcccagggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagcttcaccggctacaccatgaactgggtgctggcagggccccggccagggcctggagtgatggcctgatcaaccctacaacagcgcacccaactacgcccagaagctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccagcaccagcaccgcctacatggagctgctggagcctgctggagcgacgacaccgctgtactactgctggccgggtggccctgctgggtggccctggactactggggccaggccaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaagggcccacgctctccccctggcgc

cctgctccaggagcacctccgagagcacagccgacctgggctgcctggtaaggactacttccc
 cgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgacctgaccagcggcgtgcacaccttcccggct
 gtctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttg
 gcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagt
 tgagtccaaatatggtcccccatgcccaccatgcccagcacctgaggccgcccggggaccatca
 gtcttctgttcccccaaaaccaaggacacttctcatgatctcccggacacctgaggtcacgt
 gcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagtccaactggtaactggatggcgt
 ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccgggagagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaaggctcca
 acaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggcagccccgagagcc
 acaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc
 ctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggcgagccggaga
 acaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaggct
 aaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
 ctgcacaaccactacacagagaagacctctcctgtctctgggtaaatga

Последовательность легкой цепи (SEQ ID NO:90):

atgcccgggtgctggcccagctgctgggactgctgctgctgctgcttcccctggcgccagatgcgaca
 tccagatgaccagagccccagcagcctgagcgcagcgtggcgaccgggtgaccatcacctg
 caagcccagccagaacgtggccaccacgtgggctggtaccagcagaagcccggcaaggcccc
 aagcggctgatctacagcgcagctaccggtacagcggcgtgccagccggttcagcggcagcg
 gcagcggcaccgagttcacctgaccatcagcaacctgcagcccaggaacttcgccactacta
 ctgccagcagtaacaaccggtaccctacaccttcggccagggcaccgaagctggagatcaagcgt
 acggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
 cctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaagggtgga
 taacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgct
 gcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttg
 а

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, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных GPRC5D-специфических антител 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 S228P, что означает замену серина на пролин в положении 228; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена серина на аргинин в положении 228 обозначается как S228P, а замена любого аминокислотного остатка на серин в положении 228 обозначается как S228P. Делеция серина в положении 228 обозначается S228*. 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 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 сливаются 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 амино-

кислотные 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.

GPRC5D-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.

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 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 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 кодирующую последовательность GPRC5D-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например, промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или несколько стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), промоторы 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 шиты 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 пурииннуклеозид-фосфорилазы 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 GPRC5D-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, другой аспект изобретения описывает клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий GPRC5D, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примером 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 GPRC5D-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, CHOK1, 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 др. 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 GPRC5D-специфических антител для лечения

В настоящем документе предлагаются GPRC5D-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 GPRC5D. Соответственно, в изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение антитела, описанного в настоящем документе, например, GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Например, применение может осуществляться путем блокировки взаимодействий рецептора GPRC5D или, когда антитело конъюгируют с токсином, таким образом, направляя токсин к раку с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя лимфому, такую как множественная миелома (ММ). Антитела для применения в этих способах включают в себя

антитела, описанные выше в настоящем документе, такие как GPRC5D-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент со свойствами, описанными в табл. 1, например, с последовательностями CDR или переменными доменами, которые также представлены в дальнейшем описании этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффекторные свойства GPRC5D-специфических антител могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области.

Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая 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 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 неконструированными 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 Fc.гамма.RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. 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* 277:26733-2 6740, 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 GPRC5D, также можно усилить путем введения некоторых замен в Fc-область 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 ЕС), как описано в патенте США № 6737056.

Способы обнаружения GPRC5D

В настоящем документе предлагаются способы обнаружения GPRC5D в биологическом образце путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, пробу можно получать из мочи, крови, слюны, 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. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя обнаружение GPRC5D в биологическом образце путем приведения образца в контакт с любым из GPRC5D-специфических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с более чем одним из GPRC5D-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, образец можно привести в контакт с первым GPRC5D-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем привести в контакт со вторым GPRC5D-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или 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 многоугольного планшета, чипа, либо к сходному 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 GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение GPRC5D посредством методов, 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 ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА), 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 GPRC5D-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения GPRC5D в биологическом образце. 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 экспрессирующих GPRC5D раковых клеток у индивида можно использовать для определения того, можно ли индивида лечить терапевтическим агентом, направленным против GPRC5D.

GPRC5D присутствует в определенных концентрациях в образцах крови и сыворотки. Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы обнаружения GPRC5D в образце, полученном из крови, например, образце сыворотки, путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с GPRC5D. 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 GPRC5D можно обнаруживать в образце крови или в его 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 ELISA.

Способы диагностики рака

В настоящем документе предлагаются способы диагностики рака с экспрессией GPRC5D у индивида. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше, обнаружение GPRC5D в биологическом образце, например, в образце крови или сыворотки, обеспечивает возможность диагностики рака у индивида, от которого был получен образец. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления для оценки того, имеется ли рак у индивида, 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 индивид, от которого получен образец, имеет рак, но тип рака, имеющийся у индивида, может еще не быть диагностирован, или предварительный диагноз может быть неточным, и следовательно, обнаружение GPRC5D в биологическом образце, полученном от индивида, может позволить поставить или уточнить диагноз рака. Например, может быть известно, что у индивида имеется рак, но может быть неизвестно или неочевидно, является ли рак у данного индивида раком с экспрессией GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, поражен ли индивид раком с экспрессией GPRC5D, путем определения количества GPRC5D, присутствующего в биологическом образце, полученном от индивида; и сравнения наблюдаемого количества GPRC5D с количеством GPRC5D в контрольном или эталонном образце, причем разница между количеством GPRC5D в образце, полученном от индивида, и количеством GPRC5D в контрольном или эталонном образце служит указанием на то, что индивид поражен раком с экспрессией GPRC5D. В другом варианте осуществления количество GPRC5D, наблюдаемое в биологическом образце, полученном от индивида, можно сравнить с уровнями GPRC5D, которые, по имеющимся данным, ассоциированы с определенными формами или стадиями рака, с целью определения формы или стадии рака у индивида. В некоторых вариантах осуществления количество GPRC5D в образце, полученном от индивида, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который иммуноспецифически связывается с GPRC5D, например, с GPRC5D-специфическими антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие GPRC5D, может быть получен 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, материалы биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспира-

рациональной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя гемобластоз, такой как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способ диагностики рака с экспрессией GPRC5D будет включать в себя: приведение биологического образца индивида в контакт с GPRC5D-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), определение количества GPRC5D, присутствующего в образце, который связался с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, сравнение количества GPRC5D, присутствующего в образце, с известным стандартным или эталонным образцом; и определение того, попадают ли уровни GPRC5D индивида в пределы уровней GPRC5D, связанных с раком. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия введения или назначения специфического противоракового лечения. В другом варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия передачи результатов определения для облегчения лечения рака. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против типов рака с экспрессией GPRC5D, как, например, мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, поражен ли индивид раком с экспрессией GPRC5D, путем определения количества GPRC5D, присутствующего в образце крови или сыворотки, полученном от индивида; и сравнения наблюдаемого количества GPRC5D с количеством GPRC5D в контрольном или эталонном образце, причем разница между количеством GPRC5D в образце, полученном от индивида, и количеством GPRC5D в контрольном или эталонном образце служит указанием на то, что индивид поражен раком с экспрессией GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления контрольный или эталонный образец может быть получен от индивида, не пораженного раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления контрольный или эталонный образец может быть получен от индивида, пораженного раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от индивида, не пораженного раком с экспрессией GPRC5D, наблюдаемое увеличение количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что индивид поражен раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный образец получен от индивида, не пораженного раком с экспрессией GPRC5D, наблюдаемое уменьшение или сходство количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что индивид не поражен раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от индивида, пораженного раком с экспрессией GPRC5D, наблюдаемое сходство количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что индивид поражен раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от индивида, пораженного раком с экспрессией GPRC5D, наблюдаемое уменьшение количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что индивид не поражен раком с экспрессией GPRC5D.

В некоторых вариантах осуществления количество GPRC5D в образце, полученном от индивида, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с GPRC5D, например, с антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие GPRC5D, может быть получен из образца крови, образца сыворотки, 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 различных аспектах количество GPRC5D определяют, приводя образец в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с GPRC5D, а затем привести в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с GPRC5D. GPRC5D-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, такие как описанные в настоящем документе, можно использовать в этом качестве.

Для осуществления описанных способов диагностики в качестве "первого" и "второго" антитела и антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации GPRC5D-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ).

В некоторых вариантах осуществления количество GPRC5D 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 ELISA.

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, образец может представлять собой стандартизованный эталон количества GPRC5D в биологическом образце от здорового индивида. В некоторых вариантах осуществления уровни GPRC5D, наблюдаемые у исследуемого индивида, можно сравнивать с уровнями GPRC5D, наблюдаемыми в образцах от индивидов с известным диагнозом рака с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления контрольный индивид может быть поражен конкретным интересующим видом рака. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный индивид имеет раннюю стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный индивид имеет промежуточную стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный индивид имеет позднюю стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией GPRC5D.

Способы контроля рака

В настоящем документе предлагаются способы контроля рака с экспрессией GPRC5D у индивида. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя лимфомы, такие как множественная миелома (ММ). В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, прогрессирует, регрессирует или остается стабильным рак с экспрессией GPRC5D, путем определения количества GPRC5D, присутствующего в исследуемом образце, полученном от индивида; и сравнения наблюдаемого количества GPRC5D с количеством GPRC5D в биологическом образце, полученном сходным образом у индивида в более ранний момент времени, причем различие между количеством GPRC5D в исследуемом образце и более раннем образце служит показателем того, является ли рак прогрессирующим, регрессирующим или стабильным. В этом отношении увеличенное количество GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на прогрессирование рака с экспрессией GPRC5D. Напротив, уменьшенное количество GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на регрессию рака с экспрессией GPRC5D.

Соответственно, незначительное различие количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на стабильное течение рака с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления количество GPRC5D в биологическом образце, полученном от индивида, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или фрагментом такого антитела, специфически связывающим GPRC5D, например, с антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие GPRC5D, может быть получен из мочи, 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, материалы биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля рака с экспрессией GPRC5D будут включать в себя: приведение биологического образца от индивида в контакт с GPRC5D-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), количественную оценку GPRC5D, присутствующего в образце, сравнение количества GPRC5D, присутствующего в образце, с количеством GPRC5D, определенном в биологическом образце, полученном сходным образом от того же индивида в более ранний момент времени; и определение того, изменился ли уровень GPRC5D у индивида со временем. Увеличенное количество GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с количеством в более раннем образце может указывать на прогрессирование рака. Напротив, уменьшенное количество GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на регрессию рака с экспрессией GPRC5D. Соответственно, незначительное различие количества GPRC5D в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на стабильное течение рака с экспрессией GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления уровни GPRC5D в образце можно сравнивать с известным стандартом или эталонным образцом отдельно или в качестве дополнения к сравнению с уровнями GPRC5D, наблюдавшимися в образце в более ранний момент времени. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительная стадия назначения специфического противоракового лечения. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против рака с экспрессией GPRC5D.

В различных аспектах количество GPRC5D определяют, приводя образец в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт более чем с одним типом антител или их антиген-

связывающих фрагментов, связывающихся с GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с GPRC5D, а затем привести в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с GPRC5D. 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 табл. 1. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя гемобластоз, такой как множественная миелома (ММ).

В некоторых вариантах осуществления количество GPRC5D 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 ELISA.

Наборы для обнаружения GPRC5D

В настоящем документе предлагаются наборы для обнаружения GPRC5D в биологическом образце. Эти наборы включают в себя одно или более GPRC5D-специфических антител, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающих фрагментов и инструкции по применению набора.

Предлагаемое GPRC5D-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 индивида, контрольной или эталонной пробы, например пробы от индивида с медленно прогрессирующим раком и/или индивида без рака, одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня GPRC5D могут дополнительно включать, например, буферы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня GPRC5D. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии GPRC5D.

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

Мультиспецифические антитела

Связывающие домены антител к GPRC5D, описанные в настоящем документе, распознают клетки, экспрессирующие на своей поверхности GPRC5D. Как отмечалось выше, экспрессия GPRC5D может являться показателем раковой клетки. Более специфического нацеливания на конкретные субпопуляции клеток можно добиться путем получения биспецифических молекул, таких как антитела или фрагменты антител, которые связываются с GPRC5D и с другой мишенью, такой как CD3 и BCMA. Это достигается путем получения молекулы, которая содержит первую область, связывающуюся с GPRC5D, и вторую область, связывающуюся с другим антигеном-мишенью. Антигенсвязывающие области способны принимать любую форму, которая обеспечивает специфическое распознавание мишени, например, область связывания может представлять собой или может включать в себя вариабельный домен тяжелой цепи, Fv (комбинацию вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи), домен связывания, основанный на домене фибронектина типа III (таким как домен фибронектина, или домен, основанный на консенсусной последовательности доменов фибронектина типа III, или домен тенасцина, или домен, основанный на консенсусной последовательности доменов тенасцина типа III, например, молекулы центрина от компании Janssen Biotech, Inc., см., например, WO 2010/051274 и WO 2010/093627). Соответственно, предлагаются биспецифические молекулы, содержащие две антигенсвязывающие области, которые связываются с GPRC5D и с другим антигеном соответственно.

Некоторые мультиспецифические антитела, описанные в настоящем документе, содержат две разные антигенсвязывающие области, которые связываются с GPRC5D и CD3 соответственно. В предпочтительном варианте осуществления предлагаются мультиспецифические антитела, связывающиеся с GPRC5D и CD3 (мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3), и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который специфически связывается с GPRC5D, и вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который специфически связывается с CD3. В предпочтительных вариан-

тах осуществления мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 представляет собой биспецифическое антитело, содержащее GPRC5D-специфическое плечо, которое содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который специфически связывает CD3, и CD3-специфическое плечо, которое содержит вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который специфически связывает GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела изобретения 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 переменные и константные домены VH, CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи. Легкая цепь (LC) полноразмерного антитела включает в себя переменные и константные домены VL и CL легкой цепи. Полноразмерное антитело может не содержать С-концевого лизина (К) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях. Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелой цепи -легкая цепь, которая специфически 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.

GPRC5D-связывающее плечо мультиспецифических антител, предложенных в настоящем документе, может быть получено из любого из GPRC5D-специфических антител, описанных выше. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи клона GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597.

В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона GC5B81, GC5B465, GS5B483 или GC5B596. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит переменный домен тяжелой цепи, полученный из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах вариантов осуществления таких GPRC5D-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывает GPRC5D, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи клона GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597.

В табл. 3 приведен перечень биспецифических антител к GPRC5D×CD3, имеющих одну пару тяжелой и легкой цепей, специфическую к GPRC5D, и другую пару тяжелой и легкой цепей, специфическую к CD3, где идентификатор конкретного антитела приведен для описания антигенспецифических плеч антитела, используемых для обеспечения описанного варианта осуществления.

Таблица 3

GPRC5D-специфическое плечо=идентификатор Ab	CD3-специфическое плечо=идентификатор Ab
GC5B81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GC5B483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GC5B382	CD3B219
GC5B379	CD3B219
GC5B373	CD3B219

GC5B376	CD3B219
GC5B385	CD3B219
GC5B370	CD3B219
GC5B602	CD3B219
GC5B603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GC5B601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител GPRC5D-связывающее плечо также связывается с GPRC5D яванского макака, предпочтительно с его внеклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления GPRC5D-связывающее плечо мультиспецифического антитела представляет собой IgG или его производное, например, изомеры IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых GPRC5D-связывающее плечо имеет изомер IgG4, оно содержит замену(ы) S228P, L234A и L235A в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител второе антигенсвязывающее плечо связывается с CD3 человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления CD3-специфическое плечо биспецифического антитела к GPRC5D×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 контактирует с эпитопом, включающим в себя шесть N-концевых аминокислот CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое связывающее плечо биспецифического антитела получено из мышинового моноклонального антитела SP34, мышинового изомера 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 некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD3-связывающее плечо содержит пару из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из табл. 2.

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 изомер 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 предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее GPRC5D-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антител GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее GPRC5D-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антител GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антитела CD3B219. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела CD3B219. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее GPRC5D-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антител GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597, а также CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антитела CD3B219. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, имеющее GPRC5D-связывающее плечо, которое

содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антител GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598 или GC5B597, а также CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела CD3B219.

Пример биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 приведен в табл. 23.

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 биспецифическое антитело настоящего изобретения представляет собой диатело, кросстело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами, например описанными в настоящем изобретении способами.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ для усиления 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 участками 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 с молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ включают в себя молекулы 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) и DuoBody (Genmab A/S).

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), поперечносшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-body (CovX/Pfizer).

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).

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).

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), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Mergimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

Полноразмерные биспецифические антитела изобретения 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 изомеризации дисульфидной связи 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 сконструировать так, чтобы они способствовали 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 GPRC5D и эпитопом на CD3.

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 СНЗ-доменами в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия СНЗ-доменов, стимулируя образование гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) встраивают в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) встраивают в тяжелую цепь антитела, которое специфически 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 следующие (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, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

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 № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. 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): L351Y_F405AY407V/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 № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в СНЗ-областях двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое 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 № WO 2011/131746. 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 того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи; таким образом получают биспецифическое 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 (ДТТ), дитиозэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), 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 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к GPRC5D×CD3, также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3. В настоящем документе также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3. 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 гибридомными клетками.

Терапевтическая композиция и способы лечения с применением мультиспецифических антител и их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов

Биспецифические антитела к GPRC5D, описанные выше, например, вышеописанные биспецифиче-

ские антитела к GPRC5D×CD3, полезны в терапии. В частности, биспецифические антитела к GPRC5D полезны 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 GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака с экспрессией GPRC5D, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака с экспрессией GPRC5D, такие как множественная миелома (ММ); и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию GPRC5D. Конкретные биспецифические антитела, которые возможно применять для лечения рака, например гемобластоза, включая описанные выше конкретные виды рака, включают в себя антитела GC5B81, GC5B465, GS5B483 или GC5B596.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, содержат: а) эффективное количество мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения и б) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×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 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 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 до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия (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 предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

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, рас-

творяемых 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, смазывающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

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

Также в настоящем документе предлагаются способы уничтожения клеток GPRC5D+ путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, мультиспецифического антитела, которое связывает указанный GPRC5D и способно рекрутировать Т-клетки для уничтожения указанных клеток GPRC5D+ (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 GPRC5D×CD3 можно использовать с терапевтической целью для лечения рака у индивида.

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, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные виды рака с экспрессией GPRC5D, такие как множественная миелома (ММ); и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию GPRC5D. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно, фармацевтические композиции изобретения могут применяться для лечения или профилактики различных видов рака, включая (без ограничений), следующие: рак с экспрессией GPRC5D, включая (без ограничений) следующие виды рака: В-клеточные/плазматочные виды рака с экспрессией GPRC5D, такие как острая множественная миелома (ММ) или предраковые миеломы, такие как МГНГ (моноклональная гаммапатия неясного генеза) и ТММ (вялотекущая множественная миелома) и плазмоцитомы; и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию GPRC5D.

Аналогично, в настоящем документе дополнительно предлагается способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий в себя приведение экспрессирующих GPRC5D клеток-мишеней или ткани, содержащей такие клетки, в контакт с эффективным количеством мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими цитотоксическими или терапевтическими агентами, в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте 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; обработ-

ку костного мозга перед его трансплантацией с целью уничтожения компетентных Т-клеток и предотвращения реакции "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 индивида, а впоследствии инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавлен цитотоксический агент изобретения. Концентрации варьируются от около 10 до 1 мкМ в течение от около 30 мин до около 48 ч при температуре около 37°C. 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 индивиду. Например, мультиспецифические антитела к GPRC5D×CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией GPRC5D у индивида, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией GPRC5D включает в себя В-клеточный рак, такой как множественная миелома (ММ). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления индивид 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 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 биспецифического антитела настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное 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) × 70: 1,8. 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 ч, 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, мо-

гут быть основаны на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 70 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество биспецифического антитела настоящего изобретения в крови после введения, например, путем отбора биологического образца и использования антиидиотипических антител, нацеленных на GPRC5D-связывающую область мультиспецифических антител настоящего изобретения.

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. 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 предлагается способ лечения у индивида расстройства, с вовлечением клеток, экспрессирующих GPRC5D, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например, биспецифического антитела к GPRC5D×CD3, описанного в настоящем документе, и проведения лучевой терапии. В одном варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения рака, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например, антитела к GPRC5D×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 лечению 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 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 GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к GPRC5D×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 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, 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.

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 предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к

GPRC5D×CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается набор для диагностики рака, содержащий контейнер, который содержит биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 и один или более реагентов для обнаружения связывания антитела с GPRC5D. 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, эпитоппной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтиленetriаминпентауксусной кислотой (DTPA), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и бета-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными в данной области.

Варианты осуществления

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

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с GPRC5D и содержат:

а) определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9;

б) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10;

в) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11;

г) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12;

е) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72;

ф) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30;

г) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73;

з) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11;

и) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74;

й) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75;

к) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12;

л) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 или

м) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, в котором:

а) указанное антитело, содержащее указанную CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, указанную CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, и указанную CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, до-

нокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80;

l) указанное антитело, содержащее указанную CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65, указанную CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68, и указанную CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76, дополнительно содержит CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79 и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81; или

m) указанное антитело, содержащее указанную CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66, указанную CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и указанную CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77, дополнительно содержит CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с GPRC5D и содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 или 91.

4. Антитело по варианту осуществления 3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56, 57, 58, 92, 93 или 94.

5. Антитело по варианту осуществления 3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 или 91, и область VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56, 57, 58, 92, 93 или 94.

6. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 52, 53 или 83, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 56.

7. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 54, 84, 85, 86 или 90, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 57.

8. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 55 или 88, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 58.

9. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 82 или 87, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 92.

10. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 89, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 93.

11. Антитело по варианту осуществления 5, в котором область VH-цепи содержит SEQ ID NO: 91, спаренную с областью VL-цепи, содержащей SEQ ID NO: 94.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-11, которые связываются с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-12, которые представляют собой человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-13, которые являются рекомбинантными.

15. Антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-14, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-15, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9 имеют изотип IgG1 или IgG4.

18. Антитело по варианту осуществления 17, в котором IgG1 имеет замену K409R в области Fc.

19. Антитело по варианту осуществления 17, в котором IgG1 имеет замену F405L в области Fc.

20. Антитело по варианту осуществления 20, в котором IgG4 имеет замену F405L и замену R409K в области Fc.

21. Антитело по варианту осуществления 16, дополнительно содержащее замену S228P, замену L234A и замену L235A в области Fc.

22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-14, которые специфически связывают GPRC5D человека и вступают в перекрестную реакцию с GPRC5D яванского макака.

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17, которые индуцируют ADCC *in vitro* с EC₅₀ менее чем около 28 нМ.

24. Выделенная клетка, экспрессирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-11.

25. Клетка по варианту осуществления 24, которая представляет собой гибридому.

26. Клетка по варианту осуществления 24, в которой антитело получено рекомбинантным способом.

27. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3, содержащее:

- a) первую тяжелую цепь (HC1);
- b) вторую тяжелую цепь (HC2);
- c) первую легкую цепь (LC1) и
- d) вторую легкую цепь (LC2),

причем HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который специфически связывает CD3, а HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который специфически связывает GPRC5D, или его биспецифический фрагмент, связывающий GPRC5D×CD3.

28. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 27, в которых HC1 содержит SEQ ID NO: 25, а LC1 содержит SEQ ID NO: 26.

29. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 52, а LC2 содержит SEQ ID NO: 56.

30. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 53, а LC2 содержит SEQ ID NO: 56.

31. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 54, а LC2 содержит SEQ ID NO: 57.

32. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 55, а LC2 содержит SEQ ID NO: 58.

33. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 82, а LC2 содержит SEQ ID NO: 92.

34. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 83, а LC2 содержит SEQ ID NO: 56.

35. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 84, а LC2 содержит SEQ ID NO: 57.

36. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 85, а LC2 содержит SEQ ID NO: 57.

37. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 86, а LC2 содержит SEQ ID NO: 57.

38. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 87, а LC2 содержит SEQ ID NO: 92.

39. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 88, а LC2 содержит SEQ ID NO: 58.

40. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 89, а LC2 содержит SEQ ID NO: 93.

41. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 91, а LC2 содержит SEQ ID NO: 94.

42. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 28, в которых HC2 содержит SEQ ID NO: 85, а LC2 содержит SEQ ID NO: 57.

43. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 27-42, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

44. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по варианту осуществления 43, которые имеют изотип IgG4.

45. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 27-42, которые связывают GPRC5D на поверхности клеток человеческой миеломы.

46. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 27-42, которые связывают GPRC5D на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

47. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 27-42, которые индуцируют активацию человеческих Т-клеток *in vitro* при EC₅₀ менее чем около 0,22 нМ.

48. Биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по вариантам осуществления 27-42, которые индуцируют зависимую от Т-клеток цитотоксичность GPRC5D-экспрессирующих клеток *in vitro* при EC₅₀ менее чем около 0,89 нМ.

49. Выделенная клетка, экспрессирующая антитело или биспецифический связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 27-42.

50. Клетка по варианту осуществления 49, которая представляет собой гибридому.

51. Клетка по варианту осуществления 49, в которой антитело или биспецифический связывающий фрагмент получены рекомбинантным способом.

52. Способ лечения индивида, страдающего раком, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 27-42 нуждающемуся в этом пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

53. Способ ингибирования роста или пролиферации раковых клеток, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 27-42 для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

54. Способ перенаправления Т-клеток к экспрессирующей GPRC5D раковой клетке, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 27-42 для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

55. Способ по варианту осуществления 52, 53 или 54, в котором рак представляет собой гемобластоз.

56. Способ по варианту осуществления 55, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией GPRC5D.

57. Способ по варианту осуществления 56, в котором В-клеточный рак с экспрессией GPRC5D представляет собой множественную миелому.

58. Способ по варианту осуществления 52, включающий введение второго терапевтического агента.

59. Способ по варианту осуществления 58, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.

60. Способ по варианту осуществления 59, в котором химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2.

61. Способ по варианту осуществления 59, в котором второй терапевтический агент и биспецифическое антитело вводят указанному индивиду одновременно, последовательно или раздельно.

62. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 27-42 и фармацевтически приемлемый носитель.

63. Способ получения биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 27-42 путем культивирования клетки по любому одному из вариантов осуществления 49-51.

64. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 27-42.

65. Набор, содержащий биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент, определенные по любому одному из вариантов осуществления 27-42, и/или полинуклеотид, определенный в варианте осуществления 63, и упаковку для вышеупомянутых компонентов.

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.

Пример 1. Антигены

В связи с трудностями при выработке рекомбинантных антигенов GPRC5D линии трансфицированных клеток, демонстрирующие GPRC5D [человека (SEQ ID NO: 22), яванского макака (SEQ ID NO: 23) и мыши (SEQ ID NO: 24)], были получены при помощи стандартных способов для использования в качестве цельноклеточных антигенов в исследованиях в области образования и определения характеристик антител (табл. 4).

Таблица 4. Линии клеток, экспрессирующих GPRC5D

Белок	Клеточная линия	Промотор	Сопротивление
GPRC5D человека	HEK293T	ЦМВ	Неомицин
GPRC5D яванского макака	HEK293F	ЦМВ	Бластицидин

Пример 2. Создание антител к GPRC5D с использованием технологии фагового дисплея
Использовали два различных подхода для создания антител к GPRC5D с помощью фага: стандарт-

ный клеточный пэннинг (отрицательный отбор) и клеточный фаговый пэннинг FACS (конкурентный отбор).

Стандартный клеточный фаговый пэннинг (отрицательный отбор)

Создание собственных фаговых библиотек de novo подробно описано (Shi et al (2010) J. Mol. Biol. 397:385-396; международной патентной публикации № WO 09/085462). Эти библиотеки были построены на трех человеческих генах VH зародышевой линии (IGHV1-69, 3-23, 5-51) и четырех человеческих генах VL зародышевой линии (A27, B3, L6, 012), созданных с наличием широкого разнообразия в отношении CDR-H3. Три фаговых библиотеки de novo (DNP00004 - смесь 169 HC/LC, DNP00005 - смесь 323 HC/LC и DNP00006 - смесь 551 HC/LC), демонстрирующие варианты Fab или белок оболочки фага pIX, разделяли методом пэннинга на GPRC5D-экспрессирующих стабильных клетках HEK293 G5 (клетки-мишени) в течение раунда 1, 3, 5, а в течение раундов 2 и 4 применяли предыдущий раунд с амплифицированным фагом Fab-pIX к фоновым клеткам HEK293 (отрицательный отбор) (см. табл. 5). Фаг Fab-pIX de novo из раунда 1, связанный с клетками-мишенями, выделяли для амплификации в течение ночи. Выбранный фаг раунда 1 применяли к фоновым клеткам в течение раунда 2, при этом несвязанный фаг Fab-pIX выделяли для амплификации фага путем отрицательного отбора в течение ночи. Провели еще одну серию положительных и отрицательных раундов пэннинга - раунды 3 и 4. Итоговый раунд был выполнен с последним раундом отрицательно отобранного амплифицированного фага, разделенного на два образца пэннинга - один для клеток-мишеней и один для пэннинга на фоновых клетках.

Таблица 5. Блок-схема отрицательного отбора для стандартного клеточного фагового пэннинга

Раунд пэннинга	Клетки, используемые в качестве антигена
1	HEK293 GPRC5D человека
2	HEK293
3	HEK293 GPRC5D человека
4	HEK293
5 (разделение)	HEK293 GPRC5D человека
	HEK293

Стандартный клеточный фаговый пэннинг (фоновый отбор)

Библиотеки фагового дисплея Fab-pIX добавляли к клеткам HEK293 после инкубации в аналогичных условиях, как выполняют со стандартной процедурой клеточного пэннинга, упомянутой выше (табл. 6). После трех раундов ДНК, соответствующую фагу Fab-pIX, связанному с HEK293, использовали для получения ПЦР-ампликонов для NGS. Эти результаты NGS будут использованы в дополнительном анализе с динамическим вычитанием с помощью программного обеспечения NGS2.0, чтобы отличить возможные специфические для мишеней кандидаты Fab.

Таблица 6

Блок-схема фонового отбора для стандартного клеточного фагового пэннинга

Раунд пэннинга	Клетки, используемые в качестве антигена
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK293

Клеточный фаговый пэннинг FACS (конкурентный отбор)

Три раунда пэннинга проводили с помощью применения фага Fab-pIX к смеси клеток-мишеней и фоновых клеток одновременно (табл. 7). Для раундов 1 и 2 клетки-мишени с присоединенным фагом Fab-pIX сортировали путем использования сигнала GFP. Для отделения связанного фага Fab-pIX от отсортированных клеток применяли кислотный лизис клеток с последующим инфицированием E. coli. В итоговом раунде смесь амплифицированного фага Fab-pIX раунда 2 и клеток сортировали на две популяции: в гейт для клеток-мишеней с GFP и в гейт для фоновых клеток без GFP. Связанный фаг Fab-pIX для обеих популяций клеток был выделен путем кислотного лизиса и инфицирования E. coli.

Таблица 7. Блок-схема конкурентного отбора для клеточного фагового пэннинга методом FACS

Раунд пэннинга	Клетки, используемые в качестве антигена
1	GPRC5D_GFP человека и HEK293
2	GPRC5D_GFP человека и HEK293
3	GPRC5D_GFP человека и HEK293

Секвенирование следующего поколения (NGS) результатов фагового пэннинга

Культивирование в условиях глюкозной репрессии в течение ночи применяли к шести образцам итогового раунда пэннинга. Эти культуры использовали для приготовления минипрепарата ДНК, набор ДНК Qiagen QIAspin. Шесть образцов ДНК использовали в качестве матрицы ПЦР для получения ампликонов, которые осуществляли определение от HCDR1 до HCDR3. Шесть ампликонов очищали гель-

электрофорезом и объединяли, сохраняя версии 2.1, 3.0 отдельно для стандартного клеточного пэннинга, и полностью объединяли для клеточного пэннинга методом FACS. Эти объединенные очищенные геле-электрофорезом ампликоны были предоставлены в подразделение компании Genewiz по NGS для исследования с помощью технологии MiSeq 1×300. Файлы были переданы компанией Genewiz и загружены на локальный сервер (nas2.0). На этом сервере для загрузки, чтения и анализа файлов последовательностей использовали программное приложение NGS2.0. Для преобразования IgG были отобраны 88 верхних последовательностей в соответствии с количеством копий (> 50) и соотношением последовательностей клеток-мишеней (+) к последовательностям фоновых клеток (-) (соотношение > 5:1). Поскольку с помощью NGS определяют только переменную последовательность тяжелой цепи, полноразмерные конструкции тяжелой цепи нужно было встраивать виртуально на компьютере в соответствующие каркасные области. Кроме того, поскольку была известна только последовательность тяжелой цепи, каждого из кандидатов спаривали с четырьмя родительскими легкими цепями (A27, B3, L6, O12). Окончательное преобразование кандидатов осуществляли в виде человеческого IgG4PAA.

ИФА-скрининг и стандартное секвенирование

Из одного и того же препарата ДНК, который использовали для NGS, выполнили расщепление рестрикционным ферментом и самолигирование, чтобы вырезать ген pIX для обеспечения экспрессии растворимого Fab. Девяносто две колонии, выбранные для каждого из трех образцов пэннинга, оценивали на предмет экспрессии Fab методом ИФА и секвенировали для определения как тяжелой, так и легкой цепи методом Сэнгера. Конечные кандидаты с диверсифицированной последовательностью в областях LCDR клонировали в плазмиды экспрессии млекопитающих.

Пример 4. Предварительное описание свойств антител к GPRC5D, полученных с использованием технологии фагового дисплея

Связывание с GPRC5D

Цельноклеточный фаговый пэннинг выполнили с использованием клеток человека GPRC5D в качестве антигена, как описано выше. После анализа NGS для каждого из кандидатов была известна только последовательность тяжелой цепи. Следовательно, каждую тяжелую цепь необходимо было спаривать с 4 родительскими легкими цепями (A27, B3, L6, O12), что привело к получению 348 моноклональных антител из 87 последовательностей Hc, идентифицированных с помощью NGS. Эти моноклональные антитела изначально оценивали на предмет связывания с GPRC5D яванского макака при помощи FACS. Клеточную линию с GPRC5D яванского макака выбрали для выполнения первоначального скрининга с целью максимального увеличения потенциального сигнала связывания, так как клеточная линия GPRC5D яванского макака имела более высокий уровень экспрессии, чем клеточная линия GPRC5D человека. Вкратце, скрининг FACS выполнили путем нормализации концентрации белка до 1 мкг/мл, и 100 мкл белка смешали с 200 000 клеток на лунку. Моноклональное антитело оставляли для инкубирования с клетками в течение 1 ч при температуре 4°C. После этого клетки трижды промывали с помощью ФСБ и 0,2% FBS. Затем в качестве проявляющего реагента добавляли античеловеческое вторичное mAb, конъюгированное с PE (Jackson, № по каталогу 709-116-149). Клетки и вторичное антитело инкубировали в течение 1 ч при температуре 4°C. После этого клетки трижды промывали с помощью ФСБ и 0,2% FBS. Клетки снова промывали с помощью ФСБ и 0,2% FBS, а затем анализировали на FACSarray.

Наблюдала значительное количество нужных антител, которые связывались с GPRC5D яванского макака, включая 15 mAb с СИФ более чем 100 000, 23 mAb с СИФ менее чем 100 000, но более чем 10 000, и 63 mAb с СИФ менее чем 10 000, но более чем 1000 (табл. 8).

Таблица 8. Данные FACS по связыванию mAb, полученных с помощью NGS, с GPRC5D яванского макака. Последовательности тяжелой цепи, идентифицированные в ходе анализа NGS, были спарены с каждой родительской Lc, как показано. В качестве контроля использовали GC5M29 (легкая цепь PH9L3). Выделенные mAb имеют СИФ > 1000.

Идентификатор (ID) Hc	mAb GPRC5D [PH9L1 (A27)]		mAb GPRC5D [PH9L2 (B3)]		mAb GPRC5D [PH9L3 (L6)]		mAb GPRC5D [PH9L4 (O12)]	
	СИФ		СИФ		СИФ		СИФ	
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	GC5B25	31 324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	GC5B68	2682	GC5B69	17 416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	GC5B117	5037
GC5H15	GC5B158	14 407	GC5B159	139 766	GC5B160	84 111	GC5B161	7856
GC5H13	GC5B202	89 948	GC5B203	9173	GC5B204	15 203	GC5B205	52 663
GC5H23	GC5B242	242	GC5B243	116 641	GC5B244	249	GC5B245	469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	GC5B285	87 116
GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	GC5B72	2013	GC5B73	3827
GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	GC5B121	43 924
GC5H36	GC5B162	86773	GC5B163	21 970	GC5B164	12 2043	GC5B165	1870
GC5H31	GC5B206	467	GC5B207	3636	GC5B208	481	GC5B209	1409
GC5H29	GC5B246	202	GC5B247	3037	GC5B248	2835	GC5B249	1373
GC5H34	GC5B286	239	GC5B287	163 990	GC5B288	259	GC5B289	271
GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	GC5B332	191 978	GC5B333	1591

044685

GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	GC5B32	16 553	GC5B33	270
GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
GC5H25	GC5B122	153	GC5B123	237	GC5B124	6026	GC5B125	6197
GC5H30	GC5B166	1510	GC5B167	6266	GC5B168	32 482	GC5B169	327
GC5H47	GC5B210	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
GC5H42	GC5B250	3969	GC5B251	213 233	GC5B252	63 295	GC5B253	574
GC5H37	GC5B290	8839	GC5B291	201 024	GC5B292	110 940	GC5B293	305
GC5H45	GC5B334	160	GC5B335	1434	GC5B336	3228	GC5B337	309
GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	GC5B36	14 936	GC5B37	297
GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	GC5B81	74 140
GC5H43	GC5B126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	GC5B129	1283
GC5H49	GC5B170	1014	GC5B171	51 995	GC5B172	1434	GC5B173	332
GC5H62	GC5B214	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	GC5B217	1589
GC5H60	GC5B254	161	GC5B255	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
GC5H94	GC5B294	190	GC5B295	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	GC5B340	1798	GC5B341	290
GC5H85	GC5B38	10 809	GC5B39	1112	GC5B40	110 654	GC5B41	4379
GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	GC5B84	1547	GC5B85	3563
GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
GC5H76	GC5B174	219	GC5B175	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
GC5H68	GC5B218	21 420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292
GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	GC5B44	2694	GC5B45	1022
GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	GC5B89	41 027

044685

GC5H50	GC5B134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	GC5B137	2087
GC5H28	GC5B178	750	GC5B179	6708	GC5B180	1005	GC5B181	535
GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
GC5H51	GC5B262	159	GC5B263	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	GC5B305	1571
GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	GC5B48	1320	GC5B49	392
GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	GC5B92	1848	GC5B93	1780
GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
GC5H99	GC5B182	196	GC5B183	6421	GC5B184	309	GC5B185	280
GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
GC5H48	GC5B266	268	GC5B267	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	GC5B352	4300	GC5B353	1708
GC5H56	GC5B50	229	GC5B51	36 679	GC5B52	386	GC5B53	446
GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
GC5H61	GC5B186	543	GC5B187	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
GC5H5	GC5B17	243	GC5B18	301	GC5B19	1048	GC5B20	384
GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487
GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	GC5B104	3130	GC5B105	456
GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
GC5H73	GC5B190	236	GC5B191	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
GC5H86	GC5B230	17 885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
GC5H95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
GC5H78	GC5B106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
GC5H57	GC5B234	128 355	GC5B235	195 348	GC5B236	134 008	GC5B237	11 255
GC5H41	GC5B274	313	GC5B275	7431	GC5B278	435	GC5B279	542
GC5H58	GC5B318	2608	GC5B319	5791	GC5B320	49 616	GC5B321	4823
GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	GC5B365	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	GC5B110	208 487	GC5B111	692	GC5B112	140 269	GC5B113	104 136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	GC5B238	3698	GC5B239	4370	GC5B240	4676	GC5B241	825
GC5H88	GC5B278	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	GC5B334	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	GC5B368	6313	GC5B369	26 116

Были отобраны 40 mAb с самой высокой аффинностью связывания для дополнительного определе-

ния характеристик, которое состояло из повторного проведения исследования связывания с клетками с GPCR5D яванского макака, а также оценки связывания с клетками, экспрессирующими человеческий GPCR5D, методом FACS (табл. 9). Эти данные были проанализированы, чтобы выбрать 17 mAb для очистки и образования биспецифических антител к GPCR5D×CD3 (выделены). К факторам, используемым для выбора mAb для очистки и образования биспецифических антител к GPCR5D×CD3, относится специфичность связывания с GPCR5D человека, перекрестная реактивность с GPCR5D яванского макака и разнообразие последовательностей Hc. Например, GC5H36 спаривали с тремя различными легкими цепями и анализировали на предмет связывания (GC5B162, GC5B163, GC5B164). Было выдвинуто только GC5B164, поскольку наблюдали, что это mAb имеет более высокую СИФ с GPCR5D человека, чем GC5B162 или GC5B163.

Таблица 9. Данные FACS по связыванию mAb, полученных с помощью NGS, с клетками HEK293F, экспрессирующими GPCR5D яванского макака и человека. Для оценки специфичности связывания с GPCR5D использовали нетрансфицированные клетки HEK293F. В качестве изотипического контроля использовали TF7M1636. Выделенные mAb были выбраны для последующего анализа.

ID белка	ID HC пептида	СИФ GPCR5D		
		яванского макака	СИФ GPCR5D человека	
GC5B38	GC5H85	6864	280	СИФ 293F 215
GC5B110	GC5H75	142 277	2543	235
GC5B158	GC5H15	4923	285	235
GC5B162	GC5H36	75 139	2981	230
GC5B202	GC5H13	30 470	2152	256
GC5B218	GC5H68	10 451	277	263
GC5B230	GC5H86	19 103	364	290
GC5B234	GC5H57	134 258	1657	261
GC5B51	GC5H56	22 661	667	480
GC5B159	GC5H15	129 370	1987	258
GC5B163	GC5H36	7605	840	310
GC5B171	GC5H49	24 133	1144	1321
GC5B235	GC5H57	158 011	2643	254
GC5B243	GC5H23	67 848	20 458	221
GC5B251	GC5H42	74 510	11 418	235
GC5B281	GC5H34	109 418	5317	570
GC5B291	GC5H37	77 798	10 427	880
GC5B32	GC5H26	3597	14 656	358
GC5B36	GC5H38	5353	2002	352
GC5B40	GC5H85	67 279	4510	310
GC5B112	GC5H75	104 875	470	433
GC5B160	GC5H15	40 881	635	276
GC5B164	GC5H36	78 672	12 664	343
GC5B168	GC5H30	41 779	28 885	1238
GC5B204	GC5H13	5090	390	212
GC5B236	GC5H57	78 546	1442	192
GC5B252	GC5H42	22 010	1498	204

GC5B292	GC5H37	63 366	1872	480
GC5B320	GC5H58	63 345	22 891	231
GC5B332	GC5H35	106 515	13 348	253
GC5B25	GC5H18	22 079	705	431
GC5B69	GC5H17	1593	851	284
GC5B81	GC5H40	62 756	9986	288
GC5B89	GC5H39	31 613	1068	251
GC5B113	GC5H75	66 475	550	323
GC5B121	GC5H33	35 493	3061	299
GC5B205	GC5H13	63 610	25 199	260
GC5B237	GC5H57	2579	267	248
GC5B285	GC5H14	81 405	19 870	225
GC5B369	GC5H84	16 241	559	252
	TF7M1636	956	2621	1538
	Человеческий			
	2nd	209	316	228
	анти-hGPCR5D	9001	379	70
	изотип			
	мышинного	60	82	65
	антитела			
	неокрашенный	44	50	33

Зависимый от концентрации профиль связывания каждого из выбранных mAb против клеток HEK293, экспрессирующих GPCR5D человека, и нетрансфицированных клеток HEK293 определяли с помощью FACS (фиг. 1). Наблюдали, что все mAb связываются с GPCR5D человека зависимым от дозы образом. Также наблюдали, что три mAb GC5B36, GC5B168 и GC5B205 связываются с нетрансфицированными (нулевыми GPCR5D) клетками HEK293, и их исключили из числа приоритетных вследствие этого неспецифического взаимодействия с клетками.

Оставшиеся 14 mAb были отобраны для получения биспецифических антител CD3B219 с плечом к CD3 и B23M46 с нулевым плечом к RSV (табл. 10).

Таблица 10. Взаимоотношение между идентификаторами (ID) mAb к GPCR5D и ID биспецифических антител

ID белка mAb к GPCR5D	ID биспецифических антител	
	к CD3	к B23 нулевое
	ID биспецифич. антитела	ID биспецифич. антитела
GC5B320	GCDB44	GCDB30
GC5B243	GCDB40	GCDB26
GC5B285	GCDB43	GCDB29
GC5B332	GCDB45	GCDB31
GC5B164	GCDB35	GCDB21
GC5B251	GCDB41	GCDB27
C5B81	GCDB32	GCDB18
GC5B235	GCDB38	GCDB24
GC5B110	GCDB34	GCDB20
GC5B202	GCDB36	GCDB22
GC5B234	GCDB37	GCDB23
GC5B252	GCDB42	GCDB28
GC5B236	GCDB39	GCDB25
GC5B89	GCDB33	GCDB19

Одно биспецифическое антитело, GCDB38, осаждалось в процессе рекомбинации, а другое антитело, GCDB36, содержало > 10% агрегата. Все остальные биспецифические антитела соответствовали стандартным критериям высвобождения, а биспецифические антитела нулевого плеча были проанализированы на предмет зависящего от концентрации связывания с клетками HEK293, экспрессирующими GPCR5D человека (фиг. 2).

Наблюдали, что все биспецифические антитела связывались зависимым от дозы образом. В качестве антитела для сравнения связывания включили GC5B320 с целью понимания разницы связывания между двухвалентными mAb и одновалентными биспецифическими антителами. В качестве антитела для сравнения связывания включили GCDB44 с целью понимания разницы связывания между биспецифиче-

скими антителами к CD3 и mAb нулевого плеча к RSV. Ожидаемое снижение наблюдаемой аффинности связывания наблюдали при сравнении mAb GC5B320 с биспецифическими антителами GCDB30 и GCDB44. Кроме того, наблюдали, что GCDB44 (биспецифическое антитело к CD3) имеет немного более высокую аффинность связывания с клетками с GPRC5D человека по сравнению с GCDB30 (биспецифическое антитело нулевого плеча к RSV), демонстрируя, что плечо антител к CD3 положительно воздействует на связывание с этой клеточной линией.

Панель биспецифических антител также профилировали на предмет связывания по сравнению с клетками MM1R и H929, которые эндогенно экспрессируют GPRC5D (фиг. 3). Профиль связывания биспецифических антител на клетках MM1R и H929 сравнивали со сверхэкспрессирующими GPCR5D человека клетками HEK293 и нетрансфицированными клетками HEK293 с помощью FACS. Наблюдали, что биспецифические антитела связываются с GPRC5D, экспрессируемым эндогенно на клетках MM1R и H929, с диапазоном значений аффинности. Наиболее высокое связывание наблюдали с клетками HEK с GPRC5D человека, которые в виде сверхэкспрессируемой стабильной клеточной линии имеют намного более высокую плотность рецепторов, чем клетки MM1R или H929. GCDB37, GCDB38, GCDB39 и GCDB41 не были выбраны вследствие низкой аффинности связывания, наблюдаемой для клеток H929 и MM1R.

Зависимая от Т-клеток цитотоксичность *in vitro* Панель биспецифических антител затем профилировали на предмет активности с помощью анализа опосредованной Т-клетками цитотоксичности, используя клетки-мишени H929 и MM1R (фиг. 4А и В, табл. 11). Вкратце, клетки-мишени (H929, MM1R, OPM2, LP-1 и клетки Дауди или родительские клетки HEK и клетки HEK+GPRC5D) подсчитывали, и 10 миллионов клеток центрифугировали со скоростью 1350 об/мин в течение 3 мин, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл разведенного раствора CFSE (краситель для оценки пролиферации CFSE Cell-Trace восстанавливали в 18 мкл стерильного ДМСО, и 1 мкл раствора разбавляли в 10 мл стерильного ФСБ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 8 мин в темноте. После инкубации 1 мл HI FBS добавляли к клеточной суспензии для блокировки избытка CFSE. Клетки дважды промывали в RPMI-1640, используя FBS 10%. После разведения в 10 мл RPMI клетки подсчитывали, а жизнеспособность клеток фиксировали в протоколе. Клетки разводили до $2,2 \times 10^5$ /мл и инкубировали при температуре 37°C до применения.

Пан-Т-клетки от нормальных доноров размораживали при температуре 37°C на водяной бане, и затем клетки центрифугировали со скоростью 1350 об/мин при температуре 4°C в течение 3 мин. Надосадочные жидкости удаляли и восстанавливали в питательной среде при концентрации $1,1 \times 10^6$ /мл. 2×10^5 клеток-мишеней добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном с последующим добавлением блокатора Fc (до конечной концентрации 2 мг/мл). Все клеточные линии инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин для блокировки активности Fc-рецептора. В лунки добавляли 1×10^5 Т-клеток (соотношение эффектор:мишень 5:1). После смешивания клеток-мишеней с Т-клетками в каждую лунку добавляли 20 мкл разведенных биспецифических антител к GPRC5D×CD3. Биспецифические антитела к GPRC5D×CD3 разводили до концентрации 800 мкг/мл (10X) в ФСБ. Титрование выполняли, используя 4-кратные последовательные разведения в PBS в 96-луночном планшете с U-образным дном. Последнюю колонку оставили только для одного ФСБ (контроль несущей среды). Планшеты инкубировали при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 48 ч.

Через два дня (8 ч) планшеты центрифугировали, и 100 мкл надосадочных жидкостей хранили при температуре -80°C для анализа высвобождения цитокинов. Клетки промывали в 200 мкл ФСБ и инкубировали в 50 мкл красителя для выявления жизнеспособных клеток в ближнем ИК-диапазоне (разведение 1:200) и антител к CD25, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (разведение 1:50), в течение 20 мин при комнатной температуре. Впоследствии клетки промывали один раз в 200 мкл буферного раствора для FACS, а затем разводили в 150 мкл буферного раствора для FACS. Клетки анализировали с использованием FACSCanto II и FlowJo 7.6 в отношении цитотоксичности для мишеней (% мишеней) и Т-клеточной активации CD25+ (% живых Т-клеток). Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра), используя метод наименьших квадратов.

Таблица 11. Среднее значение EC_{50} , рассчитанное на основе оценки опосредованной Т-клетками цитотоксичности биспецифических антител к GPRC5D×CD3 с помощью клеток-мишеней H929 и MM1R

ID биспецифич. антитела	EC_{50} GPRC5D×CD3 (нМ)		Ранжирование (среднее) H929/MM1R
	H929 (n=5)	MM1R (n=3)	
GCDB32	0,39 ± 0,3	0,12 ± 0,1	2/1
GCDB33	4,29 ± 1,28	0,8 ± 0,18	7/6
GCDB34	2,13 ± 0,93	0,77 ± 0,24	5/5
GCDB35	1,39 ± 0,84	0,74 ± 0,32	4/4
GCDB36	5,2 ± 0,93	4,22 ± 0,55	8/9
GCDB40	1,2 ± 0,92	0,52 ± 0,38	3/3
GCDB41	Н/П	2,58 ± 0,15	10/8
GCDB43	0,36 ± 0,41	0,21 ± 0,29	1/2
GCDB44	10,29 ± 2,65	4,41 ± 0,29	9/10
GCDB45	2,25 ± 1	0,91 ± 0,93	6/7

Все биспецифические антитела являются активными при опосредованном Т-клетками уничтожении клеток H929 с наблюдаемым диапазоном активности (табл. 11). Аналогичный ранговый порядок наблюдали для обеих клеточных линий. Тем не менее более низкую EC_{50} наблюдали в клетках MM1R. Интересно, что аффинность связывания необязательно коррелирует с активностью в анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности. Например, в анализе цитотоксичности GCDB44 было биспецифическим антителом с самой высокой аффинностью связывания, но с самой низкой активностью. В то время как GCDB43 со сходной, хоть и немного более низкой, аффинностью связывания было наиболее активным в анализе цитотоксичности.

Для оценки функциональной перекрестной реактивности с GPRC5D яванского макака панель биспецифических антител затем профилировали на предмет опосредованной Т-клетками цитотоксичности и активации Т-клеток с помощью клеток HEK293 с GPRC5D яванского макака (фиг. 5А и В). Все биспецифические антитела были активными в этом анализе, хотя наблюдали диапазон активности в отношении клеток, экспрессирующих GPRC5D+ яванского макака.

Эффективность *in vivo*

Затем было проведено сравнительное исследование *in vivo* для понимания активности *in vivo* этих биспецифических антител к GPRC5D×CD3. GCDB32 и GCDB35 (фиг. 5А и В) были выбраны для тестирования в профилактической модели опухоли H929. Клетки H929 имплантировали мышам NSG через одну неделю после инъекции МКПК человека. Обработку биспецифическими антителами начинали одновременно с имплантацией клеток H929 и продолжали каждые 2 или 3 дня (один раз в 2 дня или один раз в 3 дня) в дозе 10 мг, 1 мг и 0,1 мг/животное - всего пять обработок. В каждой группе было использовано по десять мышей, а ФСБ включили в качестве контроля несущей среды. Обработку прекратили в день 11, а исследование было прекращено на 25 день (фиг. 6А и В) или на 26 день (фиг. 12А-Д). Все антитела к GPRC5D×CD3, протестированные в данной профилактической модели, показали 100% ингибирование роста опухоли при использовании доз 10 и 1 мг/животное, за исключением GCDB35, которое продемонстрировало приблизительно 80% ингибирование роста опухоли при использовании дозы 1 мг/животное. При использовании дозы в десять раз ниже (0,1 мг/животное) эти биспецифические антитела продемонстрировали различную степень эффективности в диапазоне от 10 до 80% ингибирования роста опухоли.

Зависимая от Т-клеток цитотоксичность *in vitro* в присутствии блокатора Fc

Для того чтобы получить представление о специфичности нацеливающего плеча к GPRC5D, панель биспецифических антител к GPRC5D×CD3 затем оценивали с помощью анализа цитотоксичности с перенаправлением Т-клеток в присутствии Fc-блока. Этот эксперимент имел решающее значение для понимания специфичности, поскольку клетками-мишенями для биспецифических антител являются В-клетки, экспрессирующие способность рецепторов Fcγ взаимодействовать с Fc-частью биспецифического антитела в анализе *in vitro*. В анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности наблюдали сдвиг активности для ряда биспецифических антител, при этом наибольший сдвиг наблюдали для GCDB40 и GCDB34 (фиг. 7А-В).

Затем выполнили непосредственное измерение связывающих взаимодействий между четырьмя наиболее активными биспецифическими антителами (GCDB32, GCDB35, GCDB40 и GCDB43) и рецепторами Fcγ (фиг. 8А-Д). Для каждого из рецепторов Fcγ и биспецифических антител, перечисленных выше, был проведен один раунд анализа Alpha Screen. Все образцы анализировали в двух повторностях. На FcγRI четыре биспецифических антитела ведут себя как B21M hIgG4 PAA. То есть они не являются конкурентными в большей степени, чем соответствующий изотипический контроль. Аналогичные раз-

личия также наблюдались между контролем hIgG1 WT (дикого типа) и четырьмя биспецифическими антителами на FcγRIIa, причем GCD43, как и изотипический контроль IgG4PAA и другие биспецифические антитела, имеет несколько более высокую аффинность к FcγRIIa. Как на FcγRIIa, так и на FcγRIIb четыре биспецифические антитела конкурируют в следующем порядке: GCDB40 > GCDB32 > GCDB43 > GCDB35. GCDB40 является наиболее конкурентным или связывается с самой высокой аффинностью с FcγRIIa и FcγRIIb. Фактически, GCDB40 конкурирует на FcγRIIa и FcγRIIb в той же степени, что и hIgG1 WT, подтверждая наблюдаемый сдвиг активности, наблюдаемый в анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности при включении блокирования Fc. Вследствие неожиданных взаимодействий с FcγRIIa и FcγRIIb GCDB40 не был продвинут.

Анализ конкурентного биннинга

Оценивали mAb к GPCR5D на предмет конкурентного связывания между ними с клетками с GPCR5D человека. Вкратце, клетки посеяли в концентрации 50 000 клеток/лунку в 50 мкл среды и дали осесть в течение 90 мин при температуре 37°C. Затем лунки блокировали с помощью 3% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре.

Метили mAb рутений (II) трис-бипиридином, N-гидроксисукцинимидом (Ru-метка) в соответствии со стандартными процедурами. В отдельном 96-луночном планшете 5 мкМ конкурентного моноклонального антитела инкубировали с 50 нМ Ru-меченного моноклонального антитела. Блокирующий раствор удаляли из клеточного планшета и добавляли 25 мкл раствора mAb. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. После трехкратного промывания планшетов с помощью ФСБ добавляли 150 мкл буфера для считывания MSD (без поверхностно-активных веществ) и выявляли связывание Ru-меченного антитела с помощью планшетного ридера MSD.

Все mAb принадлежат к одной и той же группе конкуренции, только GC5B420 и GC5B421 не полностью конкурируют с GC5B81, GC5B285 и/или GC5B332 (блокированы < 70%) (табл. 12). Предполагается, что одновременное связывание двух mAb с GPCR5D может быть стерически невозможно с учетом небольшого размера внеклеточного домена GPCR5D по сравнению с размером mAb.

Таблица 12. Биннинг эпитопов при конкурентном связывании mAb к GPCR5D. Оценивали mAb к GPCR5D на предмет конкурентного связывания между ними с клетками CGPCR5D человека

(+/-=блокирование < 70%).

Идентификатор mAb	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	+	+	+	+	+/-	+/-
GC5B164	+	+	+	+	+	+
GC5B285	+	+	+	+	+	+/-
GC5B332	+	+	+	+	+/-	+
GC5B420	+	+	+	+	+	+
GC5B421	+	+	+	+	+	+
GC5B243	+	+	+	+	+	+

Пример 4. Создание антител к GPCR5D с использованием технологии гибридомы

Три мыши Balb/c иммунизировали внутрикожно у основания хвоста плазмидной ДНК pCMV6-нео (промотор CMV), экспрессирующей полноразмерный GPCR5D человека, в дни 0, 10 и 20. В день 59 мышам провели итоговую внутрибрюшинную и внутривенную иммунизацию клетками крысиного базофильного лейкоза (RBL), сверхэкспрессирующими полноразмерный GPCR5D человека. В день 63 собрали лимфатические узлы и селезенки, выполнили обогащение В-клеток и клетки использовали для получения ~3500 гибридом, секретирующих mAb.

Пример 5. Предварительное описание свойств антител к GPCR5D, полученных с использованием гибридомной технологии

Связывание с GPCR5D

Был выполнен скрининг гибридом с помощью FACS на предмет связывания как с клетками RBL, так и с клетками RBL, экспрессирующими GPCR5D человека. Рассчитали соотношение скорректированной по фону СИФ связывания mAb с клетками GPCR5D RBL относительно нетрансфицированных клеток RBL, и любой образец с соотношением связывания более 3 считался потенциально положительным. Девяносто девять гибридом имели соотношение более 3 и были отобраны для клонирования ν -участка. Были идентифицированы, синтезированы, экспрессированы и очищены тридцать одна последовательность mAb. Два из 31 mAb продемонстрировали связывание с клетками RBL GPCR5D выше фонового уровня (фиг. 9А и 8В). GCDB390 и GCDB396 были отобраны для экспрессии, очистки и получения биспецифических антител с CD3B219 с плечом к CD3 для получения биспецифических антител GCDB46 и GCDB47, соответственно.

Зависимая от Т-клеток цитотоксичность

В анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности были проанализированы GCDB46 и

GCDB47 (фиг. 10А и 10В). Отмечено, что оба биспецифических антитела были активными, при этом полученные значения EC_{50} составляли 0,67 и 0,1 нМ, соответственно. На основе этих данных оба mAb были отобраны для проведения лидерной оптимизации вместе с тремя mAb, полученными с помощью фагов.

Пример 6. Оценка, выбор и оптимизация отобранных антител

Пять биспецифических антител к GPRC5D были выбраны для лидерной оптимизации (GCDB32, GCDB43, GCDB35, GCDB46, GCDB47) на основе данных о связывании, функции, перекрестной реактивности и селективности, представленных в табл. 13.

Таблица 13. Данные по лидерной оптимизации для биспецифических антител к GPRC5D×CD3. Биспецифические антитела оценивали на предмет связывания, функционирования, перекрестной реактивности и селективности

GPRC5D×C D3 ID	белка	Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток-мишеней			
		Связывание с GPRC5A, B, C	H929 $EC_{50} \pm$ CO (нМ)	MM1R $EC_{50} \pm$ CO (нМ)	H929 без блокатора Fc по сравн. с блокатором Fc
GCDB32	Нет связывания	0,43 ± 0,29	0,12 ± 0,01	2,4	0,19
GCDB43	Нет связывания	0,39 ± 0,07	0,54	2,8	0,95
GCDB40	Нет связывания	1,2 ± 0,83	0,52 ± 0,31	5,1	10,61
GCDB35	Низкая	1,39 ± 0,75	0,74 ± 0,26	2,7	4,65
GCDB34	Нет связывания	2,01 ± 0,74	0,77 ± 0,09	6,3	1,14
GCDB45	Нет связывания	2,36 ± 0,84	0,91 ± 0,76	2,2	2,82
GCDB33	Нет связывания	5,21 ± 1,21	0,8 ± 0,15	1,5	0,2
GCDB36	Низкая	5,57 ± 0,47	4,22 ± 0,29		3,35
GCDB46	Нет связывания	0,67			
GCDB47	Нет связывания	0,1			
GCDB48	Нет связывания	0,17			Неактивно

Лидерная оптимизация была нацелена на устранение потенциальных рисков, связанных с посттрансляционной модификацией (ПТМ) последовательностью, для GCDB32 (родительское mAb GC5B81), GCDB43 (родительское mAb GC5B285) и GCDB35 (родительское mAb GC5B164), как описано в табл. 14.

Таблица 14. Ослабление потенциальных лабильностей ПТМ последовательностей для выделенных с помощью фагов антител. Последовательности CDR Hc показаны с потенциальными лабильностями ПТМ последовательностей, которые подчеркнуты (SEQ ID NO для каждой описанной последовательности приведены в скобках)

ID GPCR5D	ID Hc GPCR5D	Hc CDR1	Hc CDR2	HcCDR3
GC5B81	GC5H40	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRWRGYKLD (9)
GC5B285	GC5H14	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAWDFGRRAVRLDY (30)
GC5B164	GC5H36	SYWIG (27)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)

Все варианты ПТМ, проанализированные для GC5B81, имели значительное снижение аффинности связывания, что свидетельствует о критическом значении этого остатка (HC W102) для паратопа (табл. 15).

Таблица 15. Последовательности CDR и данные о связывании библиотеки ПТМ GC5B81. Сайт мутации подчеркнут. Связывание было классифицировано как СИФ > 10 000=++; СИФ > 1 000=+; СИФ < 1000 (SEQ ID NO для каждой описанной последовательности приведены в скобках)

ID GPRC5D	ID тяжелой цепи	Мутация	Нс CDR1	Нс CDR2	Нс CDR3	GPRC5D человека (FACS)
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS (1)	GIIP <u>I</u> FGTANYAQKFQG (5)	ESR <u>V</u> RGYKLDY (31)	-
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS (1)	GIIP <u>I</u> FGTANYAQKFQG (5)	ESR <u>V</u> RGYKLDY (32)	-
GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS (1)	GIIP <u>I</u> FGTANYAQKFQG (5)	ESR <u>G</u> RGYKLDY (33)	-
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS (1)	GIIP <u>I</u> FGTANYAQKFQG (5)	ESR <u>A</u> RGYKLDY (34)	-
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS (1)	GIIP <u>I</u> FGTANYAQKFQG (5)	ESR <u>F</u> RGYKLDY (35)	-

Исследования связывания идентифицировали ряд мутаций для обоих GC5B285 и GC5B164, которые сохранили связывание с GPRC5D человека (табл. 16 и 17).

Таблица 16. Последовательности CDR и данные о связывании библиотеки ПТМ GC5B164. Сайт мутации подчеркнут. Связывание было классифицировано как СИФ > 10 000=++; СИФ > 1 000=+; СИФ < 1000 (SEQ ID NO для каждой описанной последовательности приведены в скобках)

ID GPRC5D	ID тяжелой цепи	Мутация	Нс CDR1	Нс CDR2	Нс CDR3	Связывание с GPR5D человека (FACS)
GC5B471	GC5H278	D55A, W33Y	SY <u>Y</u> IG (36)	IIPG <u>A</u> SDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

044685

GC5B472	GC5H277	D55A, W33V	SYVIG (37)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B473	GC5H276	D55A, W33F	SYFIG (3)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B474	GC5H275	D55A, W33G	SYGIG (38)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B475	GC5H274	D55A, W33A	SYAIG (39)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B476	GC5H273	D55S, W33Y	SYVIG (36)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B477	GC5H272	D55S, W33V	SYVIG (37)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B478	GC5H271	D55S, W33F	SYFIG (3)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B479	GC5H270	D55S, W33G	SYGIG (38)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B480	GC5H269	D55S, W33A	SYAIG (39)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B481	GC5H268	D55K, W33Y	SYVIG (36)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B482	GC5H267	D55K, W33V	SYVIG (37)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B483	GC5H266	D55K, W33F	SYFIG (3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B484	GC5H265	D55K, W33G	SYGIG (38)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B485	GC5H264	D55K, W33A	SYAIG (39)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B486	GC5H263	D55E, W33Y	SYVIG (36)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B487	GC5H262	D55E, W33V	SYVIG (37)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B488	GC5H261	D55E, W33F	SYFIG (3)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B489	GC5H260	D55E, W33G	SYGIG (38)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B490	GC5H259	D55E, W33A	SYAIG (39)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B491	GC5H258	D55Y, W33Y	SYVIG (36)	IIYPGYS DTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B492	GC5H257	D55Y, W33V	SYVIG (37)	IIYPGYS DTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

GC5B493	GC5H256	D55Y, W33F	<u>SY</u> F <u>I</u> G (3)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>Y</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (43)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B494	GC5H255	D55Y, W33G	<u>SY</u> <u>G</u> I <u>G</u> (38)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>Y</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (43)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	+
GC5B495	GC5H254	D55Y, W33A	<u>SY</u> <u>A</u> I <u>G</u> (39)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>Y</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (43)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	+
GC5B496	GC5H253	W33Y	<u>SY</u> <u>Y</u> I <u>G</u> (36)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>D</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (29)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B497	GC5H252	W33V	<u>SY</u> <u>V</u> I <u>G</u> (37)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>D</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (29)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B498	GC5H251	W33F	<u>SY</u> <u>F</u> I <u>G</u> (3)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>D</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (29)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B499	GC5H250	W33G	<u>SY</u> <u>G</u> I <u>G</u> (38)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>D</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (29)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	-
GC5B500	GC5H249	W33A	<u>SY</u> <u>A</u> I <u>G</u> (39)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>D</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (29)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	-
GC5B501	GC5H248	D55A	<u>SY</u> W <u>I</u> G (27)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B502	GC5H247	D55S	<u>SY</u> W <u>I</u> G (27)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>S</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (41)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B503	GC5H246	D55K	<u>SY</u> W <u>I</u> G (27)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>K</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (7)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B504	GC5H245	D55E	<u>SY</u> W <u>I</u> G (27)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>E</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (42)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++
GC5B505	GC5H244	D55Y	<u>SY</u> W <u>I</u> G (27)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>Y</u> S <u>D</u> T <u>R</u> Y <u>S</u> P <u>S</u> F <u>Q</u> G (43)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K <u>A</u> L <u>F</u> D <u>Y</u> (11)	++

Таблица 17. Последовательности CDR и данные о связывании библиотеки ПТМ GC5B285. Сайт мутации подчеркнут. Связывание было классифицировано как СИФ > 10 000=++; СИФ > 1 000=+; СИФ < 1000 (SEQ ID NO для каждой описанной последовательности приведены в скобках)

ID	ID тяжелой цепи	Мутация	Нс CDR1	Нс CDR2	Нс CDR3	GPRC5D человека (FACS)
GC5B463	GC5H234	D62A, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (44)	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY (48)	++
GC5B432	GC5H228	D62S, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (6)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	++
GC5B465	GC5H227	D62S, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (6)	AA <u>F</u> DFGRRAVRLDY (97)	++
GC5B433	GC5H223	D62K, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (6)	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY (49)	++

		W101V	(2)	(45)	(49)	
GC5B434	GC5H222	D62K, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>F</u> DFGRRVRLDY (97)	++
GC5B435	GC5H219	D62E, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>Y</u> DFGRRVRLDY (48)	+
GC5B436	GC5H217	D62E, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>F</u> DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B461	GC5H216	D62E, W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>G</u> DFGRRVRLDY (50)	-
GC5B462	GC5H215	D62E, W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>A</u> DFGRRVRLDY (51)	++
GC5B437	GC5H214	D62Y, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>Y</u> DFGRRVRLDY (48)	+
GC5B438	GC5H213	D62Y, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>V</u> DFGRRVRLDY (49)	+
GC5B439	GC5H212	D62Y, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>F</u> DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B440	GC5H211	D62Y, W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>G</u> DFGRRVRLDY (50)	-
GC5B441	GC5H210	D62Y, W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>A</u> DFGRRVRLDY (51)	+
GC5B442	GC5H209	W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>Y</u> DFGRRVRLDY (48)	+
GC5B443	GC5H208	W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>V</u> DFGRRVRLDY (49)	+
GC5B444	GC5H207	W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>F</u> DFGRRVRLDY (97)	+
GC5B464	GC5H206	W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>G</u> DFGRRVRLDY (50)	+
GC5B445	GC5H205	W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>A</u> DFGRRVRLDY (51)	+
GC5B446	GC5H204	D62A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (44)	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY (30)	+
GC5B447	GC5H203	D62S	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVKG (6)	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY (30)	+
GC5B448	GC5H202	D62K	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY (30)	+
GC5B449	GC5H201	D62E	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY (30)	+
GC5B450	GC5H200	D62Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>W</u> DFGRRVRLDY (30)	+

На основании этих данных о связывании выбранные mAb были получены в виде биспецифических антител к GPRC5D×CD3 и оценены на предмет опосредованной Т-клетками цитотоксичности клеток H929 (табл. 18).

Таблица 18. Функциональная активность выбранных вариантов ПТМ GPRC5D для GCDB164 и GCDB285

ID родительского mAb к GPRC5D	ID белка AA GPRC5D	ID GPRC5D×CD3	H929 EC ₅₀ (нМ)	Выбранные как лидеры
GC5B285	GC5B432	GCDB50	1,3	
	GC5B433	GCDB51	0,81	
	GC5B434	GCDB52	2,81	
	GC5B465	GCDB53	0,24	XX
	GC5B463	GCDB54	3,09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3,87	
	GC5B476	GCDB58	1,24	
	GC5B478	GCDB59	1,54	
	GC5B481	GCDB60	2,94	
	GC5B483	GCDB61	1,51	XX
	GC5B493	GCDB62	3,1	

В анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности наблюдали диапазон активности, который необязательно прогнозировался с помощью наблюдаемой аффинности связывания. Например, GC5B465 и GC5B463, которые связывались с аналогичной аффинностью с GPRC5D человека, отличаются по последовательности только 2 аминокислотами (табл. 17), и наблюдалось, что они имеют 12,5-кратную разницу активности по сравнению с биспецифическими антителами к GPRC5D×CD3 (табл. 18). На основании функциональных данных GC5B465 и GC5B483 были выбраны в качестве оптимизированных последовательностей для GC5B285 (GCDB43 как биспецифическое антитело к CD3) и GC5B164 (GCDB35 как биспецифическое антитело к CD3).

Также выполнили адаптацию человеческого каркаса для mAb к GPCR5D, полученных из мышинной гибридомы (GC5B390 и GC5B396 или GCDB46 и 47, как биспецифическое антитело к CD3, соответственно). Исследования связывания идентифицировали ряд каркасов для GC5B396 и один каркас для GC5B390, которые сохранили связывание с GPRC5D человека (табл. 19).

Таблица 19. Данные о связывании и функциональные данные по адаптации человеческого каркаса библиотек mAb к GPCR5D, полученных из гибридомы. Связывание было классифицировано как СИФ > 10 000=+++; СИФ > 5 000=++; СИФ > 1 000=+; СИФ < 1000.

ID родительского mAb к GPCR5D	ID AA mAb GPCR5D	ID тяжелой цепи	ID легкой цепи	GPCR5D человека (FACS)	ID GPCR5D ×CD3	H929 EC50 (нМ)
GPCR5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	+		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	+++	GCDB69	0, 58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	++		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	++		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	+		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	+++	GCDB68	2, 51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	+		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	++		
	GC5B533	GC5H241	GC5L56	+		
	GC5B532	GC5H240	GC5L56	+++	GCDB67	0, 61
	GC5B531	GC5H242	GC5L56	++		
	GC5B530	GC5H243	GC5L56	+++	GCDB66	1, 41
	GC5B529	GC5H241	GC5L55	++		
	GC5B528	GC5H240	GC5L55	+++	GCDB65	1, 01
	GC5B527	GC5H242	GC5L55	-		
GC5B526	GC5H243	GC5L55	++	GCDB64	1, 5	
GPCR5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	-		
	GC5B524	GC5H237	GC5L53	-		
	GC5B523	GC5H238	GC5L53	-		
	GC5B522	GC5H236	GC5L53	-		
	GC5B521	GC5H279	GC5L52	-		
	GC5B520	GC5H237	GC5L52	-		
	GC5B519	GC5H238	GC5L52	-		
	GC5B518	GC5H236	GC5L52	-		
	GC5B517	GC5H279	GC5L51	+		
	GC5B516	GC5H237	GC5L51	+		
	GC5B515	GC5H238	GC5L51	++	GCDB63	0, 52
	GC5B514	GC5H236	GC5L51	+		
	GC5B513	GC5H279	GC5L50	-		
	GC5B512	GC5H237	GC5L50	+		
	GC5B511	GC5H238	GC5L50	+		
	GC5B510	GC5H236	GC5L50	+		
	GC5B509	GC5H279	GC5L49	-		
	GC5B508	GC5H237	GC5L49	+		
	GC5B507	GC5H238	GC5L49	+		
	GC5B506	GC5H236	GC5L49	+		

На основании данных о связывании несколько моноклональных антител к GPCR5D были получены в виде биспецифических антител к CD3 и оценены на предмет опосредованной Т-клетками цитотоксичности клеток H929 (табл. 18). Функциональный анализ идентифицировал GCDB63, GCDB67 и GCDB69 в качестве активных полностью гуманизированных биспецифических антител к GPCR5D×CD3. На основе этих данных соответствующие mAb к GPCR5D, GC5B515, GC5B532 и GC5B540, были выбраны в качестве полностью гуманизированных последовательностей для GC5B390 и GC5B391.

Затем выполнили дополнительную лидерную оптимизацию полностью гуманизированных последовательностей, нацеленную на устранение потенциальных рисков, связанных с посттрансляционной модификацией последовательностей, для GC5B515, GC5B532 и GCDB540. Была получена мутация G56S в последовательности тяжелой цепи для устранения потенциального риска дезамидирования для GC5B515 (табл. 20).

Таблица 20. Связывание и функциональная активность выбранных вариантов ПТМ GPRC5D для GC5B532, GC5B540 и GCDB515

ID родительского mAb к GPRC5D	ID AA mAb GPRC5D	Мутация	GPRC5D человека (FACS)	ID GPRC5D× CD3	H929 EC50 (нМ)
GC5B540	GC5B590	M64K	+++		
	GC5B592	G99A	+		
	GC5B594	M64K, G99A	+		
GC5 B532	GC5B591	M64K	+++		
	GC5B593	G99A	+		
	GC5B595	M64K, G99A	+		
GC5 B515	GC5B596	G56S	++	GCDB72	0,15

Тяжелые цепи для GC5B532 и GC5B540 подвержены как потенциальному риску изомеризации, так и потенциальному риску окисления. Мутации M64K и G99A были получены для уменьшения такого риска (табл. 20). Все варианты, протестированные с мутацией G99A, имели значительное уменьшение аффинности связывания, тогда как варианты M64K и G56A не подверглись воздействию. Только на основании данных о связывании провели функциональную оценку GC5B596, и оно продемонстрировало активность в качестве биспецифического антитела к CD3 (GCDB72) в анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности.

Таким образом, для дополнительного определения характеристик были выбраны четыре биспецифических mAb к GPRC5D: GCDB32, GCDB53, GCDB61 и GCDB72. Ниже в табл. 21 и 22 представлены последовательности CDR и последовательности тяжелой и легкой цепей mAb к GPRC5D, используемых для получения биспецифических молекул.

Таблица 21. Последовательности CDR для 4 кандидатов mAb к GPRC5D, которые продемонстрировали связывание с GPRC5D человека и яванского макака и которые были функциональными при получении в качестве биспецифических антител к CD3.

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (SEQ ID NO 1)	GIIPIFGTANYAQKFG (SEQ ID NO 5)	ESRWRGYKLD (SEQ ID NO 9)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B465	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSKYYASSVK (SEQ ID NO 6)	AAFDGRRVRLD (SEQ ID NO 10)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B483	SYFIG (SEQ ID NO 3)	IIYPGKSDTRYSPSFQ (SEQ ID NO 7)	VYSFGGRHKALPDY (SEQ ID NO 11)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B596	GYTMN (SEQ ID NO 4)	LINPYNSDTNYAQKLQ (SEQ ID NO 8)	VALRVALDY (SEQ ID NO 12)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRPYPT (SEQ ID NO 21)

Таблица 22. Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи 4 кандидатов mAb к GPRC5D, которые продемонстрировали связывание с GPRC5D человека и яванского макака и которые были функциональны при получении в качестве биспецифических антител к CD3.

Идентификатор mAb AA	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
GC5B81	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARES RWRGYKLDYWGQGLTVTVSS	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQSISSYLNWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B465	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYWMSWVRQA PGKGLEWVSGISYSGGSKYY ASSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCAKAA FDFGRRAVRLDYWGQGLTVT VSS	53	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQSISSYLNWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B483	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYFIGWVRQM PGKGLEWMGIIPGKSDTRY SPSFQGVQVTSADKSI STAY LQWSSLKASDTAMYVCARVY SFGGRHKALFDYWGQGLTVT VSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAP RLLIYDASNRATGIPARFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFAVYYC QQRSNWPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B596	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMNWVRQA PGQGLEWMGLINPYNSDTNY AQKLQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARVA LRVALDYWGQGLTVTVSS	55	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CKASQNVATHVGVYQQKPKGKAP KRLLIYSASYRYSVPSRFRSGSG SGTEFTLTISNLQPEDFATYYC QQYNRYPTTFGQGTKLEIK	58

Пример 7. Получение антител к GPRC5D и CD3 в биспецифическом формате в IgG4 S228P, L234A, L235A

Четыре моноспецифических антитела к GPRC5D (см. табл. 21) экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc-областях замены S228P, L234A, а также L235A или S228P, L234A, L235A, F405L и R409K (плечо CD3) (нумерация согласно индексу EU). Было также создано моноспецифическое антитело CD3B219 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 25 и легкую цепь с SEQ ID NO: 26 и константную область IgG4 с заменами S228P, L234A, L235A, F405L и R409K.

Моноспецифические антитела очищали с помощью стандартных способов с использованием колонки с белком А (колонка HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела к GPRC5D×CD3 создавали, объединяя моноспецифическое mAb к CD3 и моноспецифическое mAb к GPRC5D во время обмена Fab-плечами in-vitro (как описано в WO 2011/131746). Вкратце, около 1-20 мг/мл антитела к GPRC5D/CD3 в молярном соотношении 1,08: 1 в ФСБ, pH 7-7,4, и 75 мМ 2-меркаптоэтаноламина (2-МЕА) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной точной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с помощью стандартных способов.

Тяжелые и легкие цепи биспецифических антител к GPRC5D×CD3 представлены ниже в табл. 23.

Таблица 23. Последовательности тяжелых и легких цепей биспецифических антител IgG4-РАА

Антитело		Аминокислотная последовательность
GCDB32	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVL
	Тяжелая цепь 2 GC5B81 (SEQ ID NO:52)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYATISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFGQGRVITITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGKLDYWGQGTTLVT VSS
	Легкая цепь 2 GC5B81 (SEQ ID NO:56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISL QPEDFATYYCQSYSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB53	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVL
	Тяжелая цепь 2 GC5B465 (SEQ ID NO:53)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQ APGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNLSRAEDTAVYYCAKAAFDGFRRAVRLDYWGQGT LTVSS
	Легкая цепь 2 GC5B465 (SEQ ID NO:56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISL QPEDFATYYCQSYSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB61	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVL
	Тяжелая цепь 2 GC5B483 (SEQ ID NO:54)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKGSGYSFTSYFIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGGVITISADKISIT AYLQWSSLKASDTAMYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGT LTVSS

	Легкая цепь 2 GC5B483 (SEQ ID NO:57)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRRATGIPARFSGSGSDFTLTISL EPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK
GCDB72	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
	Легкая цепь 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTEPPLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGKTLTVL
	Тяжелая цепь 2 GC5B596 (SEQ ID NO:55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQ APGQGLEWMLINPYNSDTNYAQLQGRVTMTTDTSTST AYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLVTVS S
	Легкая цепь 2 GC5B596 (SEQ ID NO:58)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVATHVGYQQK PGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSTEFTLTISNL QPEDFATYYCQYNRYPTTFGQGTKLEIK

Пример 8. Функциональная характеристика GCDB32, GCDB53, GCDB61 и GCDB72 GCDB32, GCDB53, GCDB61 и GCDB72 оценивали на предмет связывания с мышинным GPRC5D (табл. 24). Все четыре антитела связывались с мышинным GPRC5D, при этом наблюдали диапазон значений аффинности связывания.

Таблица 24. Связывание антител к GPCR5D×CD3 с мышинным GPCR5D

ID GPCR5D×CD3	Связывание FACS с мышинным GPCR5D (СИФ)
GCDB32	1151
GCDB53	2658
GCDB61	3552
GCDB72	481

Перекрестную реактивность с GPCR5D яванского макака также оценивали с помощью анализа цитотоксичности с перенаправлением Т-клеток на сверхэкспрессируемых клеточных линий GPCR5D человека и яванского макака (табл. 25). Одно биспецифическое антитело к GPCR5D×CD3 было одинаково активным против GPCR5D человека и яванского макака (GCDB32), тогда как другие протестированные биспецифические антитела были менее активными при индуцировании цитотоксичности для GPCR5D яванского макака по сравнению с GPCR5D человека.

Таблица 25. Функциональная активность лидерных антител к GPCR5D×CD3 против клеток НЕК, экспрессирующих GPCR5D человека и яванского макака

ID GPCR5D×CD3	Клетки НЕК GPCR5D человека (EC ₅₀ нМ)	Клетки НЕК GPCR5D яванского макака (EC ₅₀ нМ)
GCDB32	0,04	0,07
GCDB53	0,08	0,36
GCDB61	0,03	1,22
GCDB72	0,03	3,41

Дополнительное определение характеристик было направлена на понимание *in vitro* связывания (фиг. 11А-Е) и активности (табл. 26).

Таблица 26. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность нескольких линий В-клеток, экспрессирующих GPRC5D человека, для лидерных антител к GPRC5D×CD3

ID GPRC5D×C D3	Клетки H929, EC ₅₀ , нМ (Ранговый порядок)	MM1R EC ₅₀ , нМ (Ранговый порядок)	OPM2 EC ₅₀ , нМ (Ранговый порядок)	LP-1 EC ₅₀ , нМ (Ранговый порядок)
GCDB32	0,45 (3)	0,04 (1)	0,98 (2)	1,02 (2)
GCDB53	0,69 (4)	0,28 (4)	2,83 (4)	1,58 (3)
GCDB61	0,39 (2)	0,06 (3)	1,46 (3)	1,67 (4)
GCDB72	0,22 (1)	0,04 (1)	0,77 (1)	0,7 (1)

Хотя наблюдали диапазон значений аффинности связывания, при этом антителом с наиболее сильным связыванием было GCDB61, а наиболее слабыми - GCDB72 и GCDB32, активности *in vitro* были очень сходными с панелью биспецифических антител. Однако на основе анализа рангового порядка GCDB72 был наиболее активным среди различных проанализированных линий В-клеток. Эксперименты по связыванию и активности *ex vivo* с использованием МНК, полученных от пациента, дали в значительной степени аналогичные результаты с анализами *in vitro* (табл. 27 и фиг. 15А и 15В).

Таблица 27. Связывание биспецифических антител к GPCR5D×CD3, опосредованная Т-клетками цитотоксичность и Т-клеточная активация МНК, полученных от пациента с ММ

Пациент	ID AA GPRC5D×C D3	EC ₅₀ связывания нМ	EC ₅₀ цитотоксичности нМ	EC ₅₀ Т- клеточной активации нМ
MM303BM	GCDB32	16,1	0,36	0,18
	GCDB53	3,98	0,42	0,17
	GCDB61	5,53	0,89	0,22
	GCDB72	27,5	0,30	0,12
MM305BM	GCDB32	70,4	0,26	0,16
	GCDB53	10,2	0,26	0,19
	GCDB61	6,93	0,6	0,22
	GCDB72	65,9	0,28	0,12

GCDB61 имело самую высокую аффинность связывания с МНК пациента, тогда как GCDB72 и GCDB32 были наиболее слабыми в связывании. Опять же, несмотря на то, что наблюдались различия аффинности связывания, все биспецифические антитела демонстрировали субнанолярную эффективность в анализах цитотоксичности с перенаправлением Т-клеток. Эти молекулы были практически неотличимы на основе значений активности *in vitro* и *ex vivo*, однако данные *in vivo* обеспечили дифференцировку (фиг. 12А-Д).

Клетки H929 имплантировали мышам NSG через одну неделю после инъекции МКПК человека. Обработку биспецифическими антителами начинали одновременно с имплантацией клеток H929 и продолжали каждые 2 или 3 дня (один раз в 2 дня или один раз в 3 дня) в дозе 10 мкг, 1 мг и 0,1 мкг/животное - всего пять обработок. В каждой группе было использовано по десять мышей, а ФСБ включили в качестве контроля несущей среды. Обработку прекратили в день 11, а исследование было прекращено на 26 день (фиг. 12А-Д). Все биспецифические молекулы к GPRC5D×CD3, протестированные в данной профилактической модели, показали 100% ингибирование роста опухоли при использовании дозы 10 и 1 мкг/животное. Дифференцировка наблюдалась при самой низкой дозе, 0,1 мкг/животное, при этом GCDB72 демонстрировало превосходство перед другими протестированными биспецифическими антителами с наблюдаемым 80% ингибированием роста опухоли.

Пример 9. Профиль связывания антитела к GPRC5D на клеточной линии GPRC5D+ MM1.R

Были измерены аффинности связывания антител к GPRC5D на клеточной линии MM GPRC5D⁺ человека (MM1.R, приобретенные в ATCC (Американская коллекция типовых культур)) с помощью FACS. На фиг. 13 показано, что все лидерные антитела связывались с клетками MM.1R, экспрессирующими GPRC5D, дозозависимым образом со значениями концентрации EC₅₀ в диапазоне от 0,10 нМ до 135 нМ, причем все значения, кроме значения GC5B602, были значительно ниже, чем значения коммерческого антитела FAB6300 (R& D Systems, номер по каталогу FAB6300A, номер клона 571961), которое дало значение EC₅₀ 121,7 нМ.

Клеточные линии GPRC5D⁺ MM1.R окрашивали в течение 60 мин различными концентрациями лидерных антител для измерения поверхностных профилей связывания (n=3). Меченный фикоэритрином человеческий IgG4Fc использовали в качестве вторичного антитела для захвата сигнала (Southern

Biotech, клон HP6025, № по каталогу 9200-09). Связывание выражается как нормализованное среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции, измеренное методом FACS. Построение графиков и подгонку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6 с помощью нелинейной регрессии с функцией переменного углового коэффициента (четыре параметра) и подбора методом наименьших квадратов.

Кроме того, профиль связывания mAb к GPRC5D GC5M481 оценивали в сравнении с коммерческим антителом, используя три линии клеток GPRC5D⁺ множественной миеломы (JIM3, OPM-2 и MM.1R; клеточные линии, приобретенные в ATCC) (фиг. 14A). Кроме того, mAb к GPRC5D (GC5M481) профилировали на предмет перекрестной реактивности с использованием клеток Дауди, экспрессирующих GPRC5D яванского макака, которые демонстрировали сильное связывание по сравнению с родительскими клетками (фиг. 14A). Также пять биспецифических антител к GPRC5D×CD3 (GCDB32, GCDB48, GCDB53, GCDB61 и GCDB72) при оценке связывающей способности с использованием клеточных линий GPRC5D⁺ (JIM3, OPM-2 и MM1.R) (фиг. 14B) продемонстрировали значительную степень связывания, как видно по сдвигу на гистограмме (черная сплошная линия), по сравнению с изотипическим контролем (пунктирная линия, ограничивающая серую зону).

Пример 10. Противоопухолевая эффективность GCDB72 против подкожных ксенотрансплантатов человеческих клеток множественной миеломы MM.1S у МКПК-гуманизированных мышей NSG

Это исследование *in vivo* проводили для определения эффективности GCDB72 против адаптированных ксенотрансплантатов человеческих клеток множественной миеломы (MM) MM.1S у МКПК-гуманизированных мышей NSG. Самкам мышей NSG одинаковой массы и возраста подкожно (п/к) имплантировали человеческие клетки MM.1S (1×10^7 клеток в 200 мкл ФСБ на мышь) в правую дорсальную часть задней паховой области в день исследования 0. На 7 день после имплантации опухолевых клеток 1×10^7 человеческих МКПК (в 200 мкл ФСБ) внутривенно вводили через боковую хвостовую вену. Обработки начали проводить на 15 день, когда средний объем опухоли составлял приблизительно 72-78 мм³, каждой мыши внутривенно (в/в) вводили ФСБ или антитело DuoBody GCDB72 в дозе 0,1 мкг (0,005 мг/кг), 1 мкг (0,05 мг/кг), 10 мкг (0,5 мг/кг) и 50 мкг (2,5 мг/кг). Каждый контроль нулевого DuoBody, CD3 × нулевое и нулевое × GPRC5D, вводили в дозе 10 мкг каждой мыши. Обработки производили приблизительно каждые три дня (один раз в 3 дня) - всего семь доз. Наблюдали высокую противоопухолевую эффективность для двух самых высоких доз (10 мкг и 50 мкг) GCDB72, когда подкожные опухоли MM.1S полностью регрессировали у 100% (10 из 10 на группу) животных к концу исследования (Фиг. 16). Более того, доза 1 мкг у каждой мыши значительно ингибировала рост опухоли на 65% ($p \leq 0,0001$) по сравнению с опухолями, обработанными ФСБ, тогда как доза 0,1 мкг имела незначительный эффект (TGI=19,3%, $p=0,0023$). Эффект CD3 × нулевого антитела не был сочтен эффективным (TGI=28%, $p \leq 0,0001$), а нулевое × GPRC5D давало пренебрежительно малый эффект 3,1% TGI, $p=0,9971$. TGI определяли на 36 день, когда в группе было по меньшей мере 80% жизнеспособных животных. Значительная потеря массы тела и/или смертность начали проявляться после 36 дня вследствие GVHD (фиг. 17). Исследование было прекращено на 43 день, когда в группах оставалось 60% животных или менее.

Пример 11. Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) антител к GPRC5D

Панель моноклональных антител к GPRC5D человека была создана в качестве mAb IgG1. Кроме того, новая панель mAb к GPRC5D человека была получена в соответствии с описанием в примере 2. Ниже в табл. 28 и 29 приводятся последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи новых mAb к GPRC5D. Эти новые антитела были использованы для получения биспецифических молекул CD3, как описано в примере 7, а также они были включены в качестве mAb IgG1 для оценки активности ADCC.

Таблица 28. Последовательности CDR новой панели антител к GPRC5D

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B382	DYGMH (SEQ ID NO 61)	AIKYSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 67)	RAESGPGLDY (SEQ ID NO 72)	KSSQSVLYSSNN KNYLA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QYYSTPLT (SEQ ID NO 80)
GC5B379	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSKYYADS VKG (SEQ ID NO 28)	AAWDFGRRAVRLD Y (SEQ ID NO 30)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO 19)
GC5B373	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIPGDSSTRYSPS FQG (SEQ ID NO 29)	IGFYGRSFRIFDY (SEQ ID NO 73)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B376	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIPGDSSTRYSPS FQG (SEQ ID NO 29)	VYFGRGRHKALFD Y (SEQ ID NO 11)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B385	GYAMS (SEQ ID NO 62)	AISGSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 68)	VDRSFGRSRYTLD Y (SEQ ID NO 74)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWPLT (SEQ ID NO 20)
GC5B370 GC5B597	SYGIS (SEQ ID NO 63)	GIIPIFGNINYAOK FQG (SEQ ID NO 69)	VSRRFKRFAYYFD Y (SEQ ID NO 75)	KSSQSVLYSSNN KNYLA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QYYSTPLT (SEQ ID NO 80)
GC5B602	GYSFTGYTMN (SEQ ID NO 64)	LINPYNGDTN (SEQ ID NO 70)	VALRVALDY (SEQ ID NO 12)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 21)
GC5B603	SYAMS (SEQ ID NO 65)	AISGSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO 68)	SNFLPVVFDY (SEQ ID NO 76)	RASQSVRKSIA (SEQ ID NO 95)	TASNRAT (SEQ ID NO 79)	QQYFRAPIT (SEQ ID NO 81)
GC5B601	GFSLTSYNVH (SEQ ID NO 66)	VIWAGGSTNYNSA LMS (SEQ ID NO 71)	DGIRLRFAY (SEQ ID NO 77)	KASQNVATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYPYT (SEQ ID NO 21)

Таблица 29. Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи новой панели антител к GPRC5D

Идентифи- катор mAb AA	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
GC5B382	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDYGMHWVRQAPGKG LEWVSAIKYSGGSTYYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNLSRA EDTAVYYCAKRAESGPGLDYWG QGTLTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNY LAWYQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDEVAVYYCQ QYYSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B379	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYWMSWVRQAPGKG LEWVSGISYSGGSKYYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNLSRA EDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRL DYWGQGLTVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	56
GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG	84	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQQ	57

	LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQG QVTISADKSI STAYLQWSSLKA SDTAMYYCARIGFYGRSFRIFD YWGQGT LVTVSS		KPGQAPRLLIYDASNRATG IPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWP LTFGQGTKVEIK	
GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KSGSYFTSYWIGWVRQMPGKG LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQG QVTISADKSI STAYLQWSSLKA SDTAMYYCARVYSFGGRHKALF DYWGQGT LVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATG IPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWP LTFGQGTKVEIK	57
GC5B385	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSGYAMSWVRQAPGKG LEWVAISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVDRSFGRSRYTL DYWGQGT LVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATG IPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWP LTFGQGTKVEIK	57
GC5B370 GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYGISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGNINYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVSRFRKFAYYF DYWGQGT LVTVSS	87	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRESGVPRDFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDEVAVYYCQ QYYSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFTGYTMNWVRQAPCQG LEWMGLINPYNGDTNYAQKLQG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARVALRVALDYWGQ GTLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCKASQNVATHVWGYYQQ KPGKAPKRLIYSASYRYSG VPSRFSGSGSGTEFTLTIS NLQPEDFATYYCQQYNRYP YTFGQGTKLEIK	58
GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVAISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKSNFLPVVFDYWG QGT LVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVRKS LAWYQQ KPGQAPRLLIYTASN RATG IPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQYFRAP ITFGQGTKVEIKK	93
GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTC TVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKA LEWLAVIWAGGSTNYNSALMSR LTISKDTSKQVVLMTNMRAE DTATYYCARDGIRLRFAYWGQG TLVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCKASQNVATHVWGYYQQ KPGQAPRLLIYSASYRYSG IPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYNRYP YTFGQGTKLEIK	94

Активность ADCC в отношении клеток H929 (табл. 30 и 31). Вкратце, клетки множественной миеломы метили кальцеином-AM в течение 30 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в концентрации $0,2 \times 10^6$ /мл в RPMI+10% HI FBS после двух промываний в ФСБ. МКПК размораживали и ресуспендировали после промывания в ФСБ в концентрации 3×10^6 клеток на мл в питательной среде RPMI. Смешивали 10000 или 50000 клеток-мишеней с 100000 или 2500000 МКПК в присутствии антитела и инкубировали в течение 3 ч в инкубаторе CO₂ при температуре 37°C. После того как инкубационный планшет центрифугировали при 200 g в течение 4 мин, 100 мкл надосадочной жидкости перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили интенсивность флуоресценции при 485/535 нм. Значения в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) были нанесены на график для расчета процентной доли лизиса.

Таблица 30. Антителозависимая цитотоксичность клеток H929 для моноклональных антител к GPRC5D с IgG1 Fc

ID белка	ID белка	EC ₅₀	%
IgG4	IgG1	цитотоксичности	лизиса
GPRC5D	GPRC5D	H929 (пМ)	
GC5B243	GC5B382	1346,5	29,14
GC5B285	GC5B379	87,4	17,3
GC5B332	GC5B373	244,2	32,94
GC5B164	GC5B376	22,0	32,21
GC5B320	GC5B385	944,0	29,73
GC5B251	GC5B370	24,2	8
GC5B515	GC5B602	27 721,7	20
GC5B420	GC5B603	3,4	16
GC5B483	GC5B599	7,4	14
GC5B540	GC5B601	169,6	14
GC5B465	GC5B598	2,0	12
GC5B251	GC5B597	705,1	10

Таблица 31. Сравнение антителозависимой цитотоксичности и опосредованной Т-клетками цитотоксичности клеток H929

ID белка	ID DuoBody	ADCC	Перенаправление CD3
		EC ₅₀	EC ₅₀ опосредованной
IgG1 GPRC5D	к	цитотоксичности	Т-клетками
	GPRC5D×CD3	H929 (пМ)	цитотоксичности H929
			(нМ)
GC5B382	GCDB40	1346,5	1,2 ± 0,83
GC5B379	GCDB43	87,4	0,39 ± 0,07
GC5B373	GCDB45	244,2	2,36 ± 0,84
GC5B376	GCDB35	22,0	1,39 ± 0,75
GC5B385	GCDB44	944,0	> 10
GC5B370	GCDB41	24,2	> 10
GC5B602	GCDB72	27 721,7	0,15
GC5B603	GCDB48	3,4	0,17
GC5B599	GCDB61	7,4	1,51
GC5B601	GCDB69	169,6	0,58
GC5B598	GCDB53	2,0	0,24

Наблюдали диапазон значений активности от 2 пМ до 27,7 нМ. Аффинность связывания необязательно прогнозировала эффективность в анализе ADCC. Например, GC5B382 и GC5B379 имели сходную аффинность связывания с клетками GPRC5D человека, однако они имели 15-кратную разницу цитотоксичности к клеткам H929 в анализе ADCC. Аналогичным образом, цитотоксическая индукция в качестве биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 не прогнозировала активность в анализе ADCC, как показано на примере GC5B370 и GC5B602. В формате в виде биспецифического антитела к CD3 GC5B602 (GCDB63) имело субнаномолярную активность против клеток H929, тогда как GC5B370 в виде биспецифического антитела к CD3 (GCDB41) было по существу неактивным. Те же v-области в формате в виде mAb IgG1 привели к противоположному результату в анализе ADCC, при этом GC5B370 наблюдали как более активное (в ~1100x раз) по сравнению с GC5B602.

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Человеческая	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431 и GC5B429- HCDR1	SYAIS
2	PRT	Человеческая	GC5B379, GC5B598, GC5B465, GC5B285, GC5B463, GC5B432, GC5B433, GC5B434, GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462, GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464, GC5B445, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449 и GC5B450 -HCDR1	NYWMS
3	PRT	Человеческая	GC5B483, GC5B473, GC5B478, GC5B488, GC5B493 и GC5B498 -HCDR1	SYFIG
4	PRT	Человеческая	GC5B596-HCDR1	GYTMN
5	PRT	Человеческая	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431 и GC5B429- HCDR2	GIIPIFGTANYAQKFG
6	PRT	Человеческая	GC5B598, GC5B465, GC5B432 И GC5B447- HCDR2	GISYSGGSKYYASSVKG
7	PRT	Человеческая	GC5B599, GC5B483,	IYYPGKSDTRYSPSFQG

044685

			GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485 И GC5B503- HCDR2	
8	PRT	Человеческая	GC5B596-HCDR2	LINPYNSDTNYAQLQGG
9	PRT	Человеческая	GCB581-HCDR3	ESRWRGYKLD
10	PRT	Человеческая	GC5B598, GCB5465- HCDR3	AAFDFGRRRAVRLD
11	PRT	Человеческая	GC5B376, GC5B599, GC5B483, GC5B164, GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485, GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499, GC5B500, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504 И GC5B505 -HCDR3	VYSFGGRHKALFDY
12	PRT	Человеческая	GC5B602, GCB596- HCDR3	VALRVALDY
13	PRT	Человеческая	GC5B382, GC5B379, GC5B370, GC5B598, GC5B597, GC5B81, GC5B465-LCDR1	RASQSISSYLN
14	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599,	RASQSVSSYLA

			GC5B483-LCDR1	
15	PRT	Человеческая	GC5B605, GC5B601, GC5B596-LCDR1	KASQNVATHVG
16	PRT	Человеческая	GC5B81, GC5B465, GC5B379, GC5B598- LCDR2	AASSLQS
17	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR2	DASNRAT
18	PRT	Человеческая	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR2	SASYRYS
19	PRT	Человеческая	GC5B379, GC5B598, GC5B81, GC5B465- LCDR3	QQSYSTPLT
20	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR3	QQRSNWPLT
21	PRT	Человеческая	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	Человеческая	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLCDAEGP WGIILES LAILGIVVTILLLL AFLFLMRKIQDCSQWNVLP LLFLLSVLGLFGLAFAFIIEL NQQTAPVRYFLFGVLFALCFS CLLAHASNLVKLVGRGVSFSW TTILCIAIGCSLLQIIAIEY VTILIMTRGMMFVNMTPCQLNV DFVLLVYVLFMLALTFVFSK ATFCGPCENWKQHGRLIFITV LFSIIWVWISMLLRGNPQF QRQPQWDDPVVCIALVTNAWV FLLLYIVPELCLILYRSCRQEC PLQGNACPVTAYQHSFQVENQ ELSRARDSGAEEDVALTSYG TPIQPQTVDPTQECFIPQAKL SPQQDAGGV
23	PRT	Яванский макак	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGP WGIILES LAILGIVVTILLLL AFLFLMRKIQDCSQWNVLP LLFLLSVLGLFGLAFAFIIQL NQQTAPVRYFLFGVLFALCFS CLLAHASNLVKLVGRVSVFSW TTILCIAIGCSLLQVI AIEY

					VTLMIMTRGMMFVHMTPTYQLNV DFVLLVYVFLMALTFFVSK ATFCGPCENWKQHGRLI FITV LFSIIIWVVWISMLLRGNPQF QRQPQWDDPVVCIALVTNAWV FLLLYIVPELCILYRSCRQEC PSQGHACPVYAYQRSFQVENQ ELSRARDSGAEEDVALTSFG TPIQPQTVDPQTQECFI PRAKL SPQQDAGV
24	PRT	Мышиная	GPRC5D		MYEDCVKSTEDYYLFCDNEGP WAIVLESLAVIGIVVTILLLL AFLFLMRKVQDCSQWNVLPQ FLFLLAVLGLFGLTFAFIIQL NHQTAPVRYFLFGLVFAICFS CLLAHASNLVKKLVRGRVSVFW TTILFIAIGVSLLOTTIIAIEY VTLMIMTRGLMFEHMTPTYQLNV DFVLLIYVFLMALTFFVSK ATFCGPCENWKQHGRLI FATV LVSIIIWVVWISMLLRGNPQL QRQPHWDDAVICIGLVTNAWV FLLIYIIPELSILYRSCRQEC PTQGNVCQVPVYQRSFRMDTQ EPTRARDSGAEEDVALTAYG TPIQLQSADPSREYLI PSATL SPQQDAGL
25	PRT	Человеческая	ТЯЖЕЛАЯ CD3B219	ЦЕПЬ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYA ASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNGF NSYVSWFAYWGQGLVTVSS
26	PRT	Человеческая	ЛЕГКАЯ CD3B219	ЦЕПЬ	QTVVTVQEPSTLVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLGSGVPED EAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL
27	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504 И GC5B505 -HCDR1	SYWIG	

28	PRT	Человеческая	GC5B379, GC5B285, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464 И GC5B445-HCDR2	GISYSGGSKYYADSVKG
29	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499 И GC5B500- HCDR2	I IYPGSDTRYSPSFQG
30	PRT	Человеческая	GC5B379, GC5B285, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449 И GC5B450-HCDR3	AAWDFGRRVRLDY
31	PRT	Человеческая	GC5B427-HCDR3	ESRYRGYKLDY
32	PRT	Человеческая	GC5B428-HCDR3	ESRYRGYKLDY
33	PRT	Человеческая	GC5B430-HCDR3	ESRGRGYKLDY
34	PRT	Человеческая	GC5B431-HCDR3	ESRARGYKLDY
35	PRT	Человеческая	GC5B429HCDR3-VH	FSRFRGYKLDY
36	PRT	Человеческая	GC5B471, GC5B476, GC5B486, GC5B481, GC5B491 И GC5B496, -HCDR1	SYVIG
37	PRT	Человеческая	GC5B497, GC5B472, GC5B477, GC5B482, GC5B487 И GC5B492- HCDR1	SYVIG
38	PRT	Человеческая	GC5B474, GC5B479, GC5B484, GC5B489, GC5B494 И GC5B499- HCDR1	SYGIG
39	PRT	Человеческая	GC5B475, GC5B480, GC5B485, GC5B490, GC5B495 И GC5B500- HCDR1	SYAIG
40	PRT	Человеческая	GC5B471, GC5B472,	I IYPGASDTRYSPSFQG

044685

			GC5B473, GC5B474, GC5B475 И GC5B501- HCDR2	
41	PRT	Человеческая	GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480 И GC5B502 -HCDR2	I I Y P G <u>S</u> S D T R Y S P S F Q G
42	PRT	Человеческая	GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490 И GC5B504- HCDR2	I I Y P G <u>E</u> S D T R Y S P S F Q G
43	PRT	Человеческая	GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495 И GC5B505- HCDR2	I I Y P G <u>Y</u> S D T R Y S P S F Q G
44	PRT	Человеческая	GC5B463 И GC5B446- HCDR2	G I S Y S G G S K Y Y A <u>A</u> S V K G
45	PRT	Человеческая	GC5B433, GC5B434 И GC5B448-HCDR2	G I S Y S G G S K Y Y A <u>K</u> S V K G
46	PRT	Человеческая	GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462 И GC5B449-HCDR2	G I S Y S G G S K Y Y A <u>E</u> S V K G
47	PRT	Человеческая	GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441 И GC5B450- HCDR2	G I S Y S G G S K Y Y A <u>Y</u> S V K G
48	PRT	Человеческая	GC5B463, GC5B435, GC5B437 И GC5B442-HCDR3	A A <u>Y</u> D F G R R A V R L D Y
49	PRT	Человеческая	GC5B432, GC5B433, GC5B438 И GC5B443-HCDR3	A A <u>Y</u> D F G R R A V R L D Y
50	PRT	Человеческая	GC5B461, GC5B440 И GC5B464-HCDR3	A A <u>G</u> D F G R R A V R L D Y
51	PRT	Человеческая	GC5B462, GC5B441	A A A <u>A</u> D F G R R A V R L D Y

			И GC5B445-HCDR3	
52	PRT	Человеческая	GC5B81-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARESRWRGY KLDYWGQGLTLTVSS
53	PRT	Человеческая	GC5B598, GC5B465-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYWMSWVRQAPG KGLEWVSGISYSGSKYYASS VKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKAAFDGFR RAVRLDYWGQGLTLTVSS
54	PRT	Человеческая	GC5B599, GC5B483-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGSFTSYFIGWVRQMPG KGLEWMGIIPGKSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCARVYSFGGR HKALFDYWGQGLTLTVSS
55	PRT	Человеческая	GC5B596-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYSFTGYTMNWVRQAPG QGLEWMGLINPYNSDTNYAQK LQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARVALRVAL DYWGQGLTLTVSS
56	PRT	Человеческая	GC5B379, GC5B598, GC5B81 и GC5465-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYQCQSYSTPLTFGQGTKVE IK
57	PRT	Человеческая	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFA

				VYYCQQRSNWPLTFGQGTKVE IK
58	PRT	Человеческая	GC5B596, GC5B602- VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVATHVGYQQKPGK APKRLIYSASYRYSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISNLQPEDFA TYYCQQYNRYPTFGQGTKLE IK
59	PRT	Человеческая	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSLGK
60	PRT	Человеческая	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDK THTCPPCPAPELGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN

				YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
61	PRT	Человеческая	GC5B382-HCDR1	DYGMH
62	PRT	Человеческая	GC5B385-HCDR1	GYAMS
63	PRT	Человеческая	GC5B370, GC5B597- HCDR1	SYGIS
64	PRT	Человеческая	GC5B602-HCDR1	GYSFTGYTMN
65	PRT	Человеческая	GC5B603-HCDR1	SYAMS
66	PRT	Человеческая	GC5B601-HCDR1	GFSLTSYNVH
67	PRT	Человеческая	GC5B382-HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
68	PRT	Человеческая	GC5B603, GC5B385- HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
69	PRT	Человеческая	GC5B370, GC5B597- HCDR2	GIIPIFGNINYAQKFQG
70	PRT	Человеческая	GC5B602-HCDR2	LINPYNGDTN
71	PRT	Человеческая	GC5B601-HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
72	PRT	Человеческая	GC5B382-HCDR3	RAESGPGLDY
73	PRT	Человеческая	GC5B373-HCDR3	IGFYGRSFRIFDY
74	PRT	Человеческая	GC5B385-HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY
75	PRT	Человеческая	GC5B370, GC5B597- HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
76	PRT	Человеческая	GC5B603-HCDR3	SNFLPVVFDY
77	PRT	Человеческая	GC5B601-HCDR3	DGIRLRFAY
78	PRT	Человеческая	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR2	WASTRES
79	PRT	Человеческая	GC5B603-LCDR2	TASNRAT
80	PRT	Человеческая	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR3	QQYYSTPLT
81	PRT	Человеческая	GC5B603-LCDR3	QQYFRAPIT
82	PRT	Человеческая	GC5B382-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSQYGMHWVRQAPG

				KGLEWVSAIKYSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKRAESGPG LDYWGQGTTLVTVSS
83	PRT	Человеческая	GC5B379-VH	EVQLESGGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSNYWMSWVRQAPG KGLEWVSGISYSGGSKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKAAWDFGR RAVRLDYWGQGTTLVTVSS
84	PRT	Человеческая	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWGMGIYPGSDTRYSPS FQGQVTISADKSI STAYLQWS SLKASDTAMYCARIGFYGRS FRIFDYWGQGTTLVTVSS
85	PRT	Человеческая	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWGMGIYPGSDTRYSPS FQGQVTISADKSI STAYLQWS SLKASDTAMYCARVYSFGGR HKALFDYWGQGTTLVTVSS
86	PRT	Человеческая	GC5B385-VH	EVQLESGGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSGYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVDRSFGR SRYTLDYWGQGTTLVTVSS
87	PRT	Человеческая	GC5B370, GC5B597- VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGGTFSSYGISWVRQAPG QGLEWGMGIPIFGNINYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCARVSRRFKR FAYYFDYWGQGTTLVTVSS
88	PRT	Человеческая	GC5B602-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS

				CKASGYSFTGYTMNWVRQAPG QGLEWMGLINPYNGDTNYAQK LQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARVALRVAL DYGQGTGLVTVSS
89	PRT	Человеческая	GC5B603-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSNFLPVV FDYWGQGTGLVTVSS
90	ДНК	Человеческая	Легкая цепь GC5B596	atgcggtgctgcccagctg ctggactgctgctgtgtgc ttccctggcgccagatgcgac atccagatgaccagagcccc agcagcctgagcgccagcgtg ggcgaccgggtgaccatcacc tgcaaggccagccagaacgtg gccaccacgtgggtgtgtac cagcagaagccggcaaggcc cccaagcggctgatctacagc gccagctaccggtacagcggc gtgccagccggttcagcggc agcggcagcggcaccgagttc accctgaccatcagcaacctg cagcccaggacttcgccacc tactactgccagcagtagaac cggtagccctacaccttcggc cagggcaccaagctggagatc aagcgtacggtggctgcacca tctgtcttcattctcccgcca tctgatgagcagttgaaatct ggaactgcctctgtgtgtgc ctgctgaataacttctatccc agagaggccaagtagcagtg

				aaggtggataacgcctccaa tcgggtaactcccaggagagt gtcacagagcaggacagcaag gacagcacctacagcctcagc agcacctgacgctgagcaaa gcagactacgagaacacaaa gtctacgcctgcaagtcacc catcagggcctgagctcgccc gtcacaagagcttcaacagg ggagagtgttga
91	PRT	Человеческая	GC5B601-VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLT CTVSGFSLTSYNVHWIRQPPG KALEWLAVIWACGSTNYNSAL MSRLTISKDTSKSQVVLMTN MRAEDTATYYCARDGIRLRFA YWGQTLVTVSS
92	PRT	Человеческая	GC5B382, GC5B597, GC5B370-VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKKSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQYYSTPLTFG QGTKVEIK
93	PRT	Человеческая	GC5B603-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVRKS LAWYQQKPGQ APRLLIYTASNRTGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQYFRAPITFGQGTKVE IKK
94	PRT	Человеческая	GC5B601-VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCKASQNVATHVGVYQQKPGQ APRLLIYSASYRYSIGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFFA VYYCQQYNRYPTFGQGTKLE IK
95	PRT	Человеческая	GC5B603-LCDR1	RASQSVRKS LA
96	ДНК	Человеческая	Тяжелая цепь GC5B596	atggcctgggtctggaccctg ctgttctgatggccgctgcc cagagcatccaggcccaggtg cagctggtgcagagcggcgcc gaggtgaagaagcccggcgcc agcgtgaaggtgagctgcaag gccagcggctacagcttcacc ggctacacatgaactgggtg

				cggcaggccccggccagggc ctggagtggatggcctgatc aaccctacaacagcgacacc aactacgccagaagctgcag ggccgggtgaccatgaccacc gacaccagcaccagcaccgcc tacatggagctgcggagcctg cggagcgacgacaccgccgtg tactactgcgccgggtggcc ctgcgggtggccctggactac tggggccagggcaccctggtg accgtgagcagcgcctccacc aagggccatcgtcttcccc ctggcgcctgtctcaggagc acctccgagagcacagccgcc ctgggctgcctggtcaaggac tacttccccgaaccggtgacg gtgtcgtggaactcaggcgcc ctgaccagcggcgtgcacacc tccccggtgtcctacagtcc tcaggactctactccctcagc agcgtggtgaccgtgcctcc agcagcttgggcacgaaaacc tacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaaccaaggtg gacaagagagttgagtccaaa tatggtccccatgccacca tgcccagcacctgaggccgcc gggggaccatcagtcttctg llcccccaaaaccaaggac actctcatgatctccggacc cctgaggtcacgtgcgtggtg gtggacgtgagccaggaagac cccgaggtccagttcaactgg tacgtggatggcgtggaggtg
--	--	--	--	---

				cataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagttcaacagc acgtaccgtgtgtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggac tggctgaacggcaaggagtac aagtgcaaggctccaacaaa ggcctcccgtcctccatcgag aaaaccatctccaagccaaa gggcagccccgagagccacag gtgtacaccctgccccatcc caggaggagatgaccaagaac caggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctaccccagc gacatcgccgtggagtgggag agcaatgggcagccggagaac aactacaagaccacgcctccc gtgctggactccgacggctcc ttcttctctacagcaggcta accgtggacaagagcaggtgg caggaggggaatgtcttctca tgctccgtgatgcatgaggct ctgcacaaccactacacacag aagagcctctccctgtctctg ggtaaatga
--	--	--	--	---

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с GPRC5D, включающие CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи (VH) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55 и переменную область легкой цепи (VL) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 58.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются рекомбинантными.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, которые имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют изотип IgG1 или IgG4.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, в котором IgG1 содержит замену K409R в области Fc.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, в котором IgG1 содержит замену F405L в области Fc.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, в котором IgG1 содержит замену F405L и замену R409K в области Fc.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат замену S228P, замену L234A и замену L235A в

области Fc.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывают GPRC5D человека и вступают в перекрестную реакцию с GPRC5D яванского макака.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцируют ADCC *in vitro* с EC50 менее чем около 28 нМ.

15. Рекомбинантная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14.

16. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

- a) первую тяжелую цепь (HC1);
- b) вторую тяжелую цепь (HC2);
- c) первую легкую цепь (LC1) и
- d) вторую легкую цепь (LC2),

где пара HC1 и LC1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает CD3, и пара HC2 и LC2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает GPRC5D, где HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, LC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и где HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, а LC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

17. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где биспецифическое антитело или его биспецифический связывающий фрагмент имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

18. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где биспецифическое антитело или его биспецифический связывающий фрагмент имеют изотип IgG4.

19. Выделенное биспецифическое антитело GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где связывающая GPRC5D участок биспецифического антитела содержит варируемую область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, участок варируемой области легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

20. Выделенное биспецифическое антитело GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где CD3 связывающий участок биспецифического антитела содержит варируемую область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, область варируемой области легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и Fc-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, где Fc-домен дополнительно содержит замену F405L и R409K.

21. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где биспецифическое антитело или его биспецифический связывающий фрагмент связывают GPRC5D на поверхности клеток человеческой миеломы.

22. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где биспецифическое антитело или биспецифический связывающий фрагмент связывают GPRC5D на поверхности клеток человеческой множественной миеломы.

23. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где биспецифическое антитело или его биспецифический связывающий фрагмент индуцируют активацию человеческой Т-клетки *in vitro* при EC50 менее чем около 0,22 нМ.

24. Выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по п.16, где антитело или его биспецифический связывающий фрагмент индуцируют зависимость от Т-клеток цитотоксичность GPRC5D- экспрессирующих клеток *in vitro* с показателем EC50 менее чем около 0,89 нМ.

25. Рекомбинантная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по любому из пп.16-24.

26. Способ лечения индивида, страдающего гемобластозом, где способ включает введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента по п.16 нуждающемуся в этом пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

27. Способ ингибирования роста или пролиферации клеток гемобластоза, где способ включает введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента по п.16 пациенту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения рака.

28. Способ перенаправления Т-клеток к экспрессирующей GPRC5D раковой клетке, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического

антитела к GPRC5D×CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по п.16 нуждающемуся в этом пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

29. Способ по любому из пп.26-28, в котором гемобластоз представляет собой В-клеточный рак с экспрессией GPRC5D.

30. Способ по п.29, в котором В-клеточный рак с экспрессией GPRC5D представляет собой множественную миелому.

31. Способ по п.26, где способ дополнительно включает введение второго терапевтического агента.

32. Способ по п.31, в котором второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический препарат или средство для нацеленной противораковой терапии.

33. Способ по п.32, в котором химиотерапевтический препарат представляет собой цитарабин, антрациклин, дигидрохлорид гистамина или интерлейкин 2.

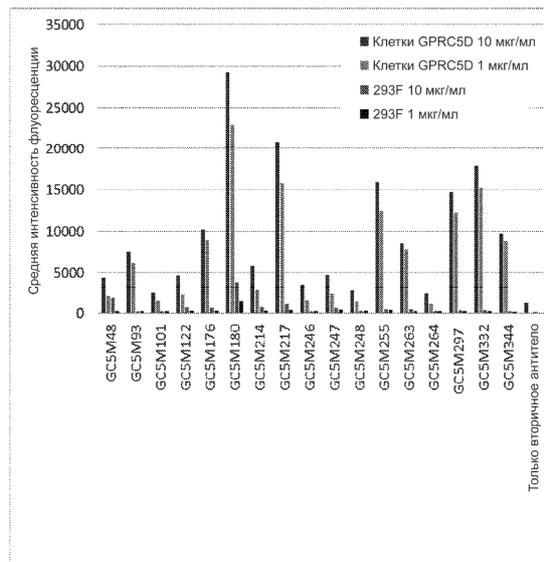
34. Способ по п.32, в котором второй терапевтический агент и биспецифическое антитело вводят указанному индивиду одновременно или последовательно.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16 и фармацевтически приемлемый носитель.

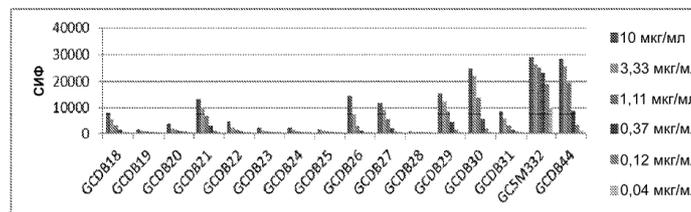
36. Способ получения выделенного биспецифического антитела к GPRC5D×CD3 или его биспецифического связывающего фрагмента по п.16, где способ включает культивирование клетки по п.25.

37. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16.

38. Набор для детекции GPRC5D, содержащий выделенное биспецифическое антитело к GPRC5D×CD3 или его биспецифический связывающий фрагмент по п.16 и/или синтетический полинуклеотид по п.37 и инструкцию по его применению.



Фиг. 1

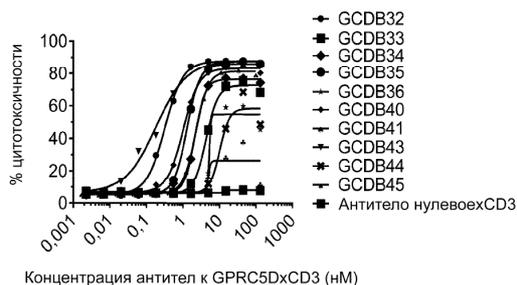


Фиг. 2



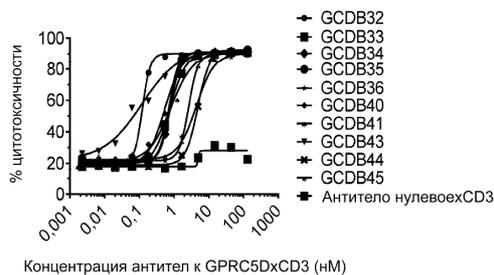
Фиг. 3

Клетки H929, блокатор Fc отсутствует (48 ч)
 Донор Т-клеток: M6521 (n = 5)



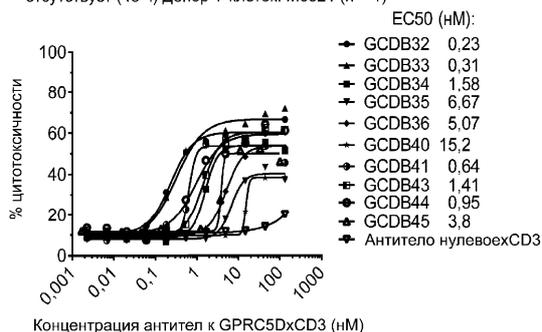
Фиг. 4А

Клетки MM1R, блокатор Fc отсутствует (48 ч)
 Донор Т-клеток: M6521 (n = 3)



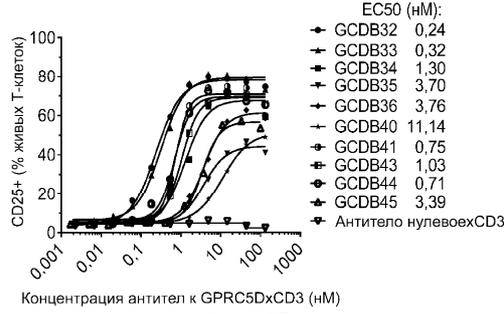
Фиг. 4В

Клетки 293F-GPRC5D (яванского макака), блокатор Fc
 отсутствует (48 ч) Донор Т-клеток: M6521 (n = 1)

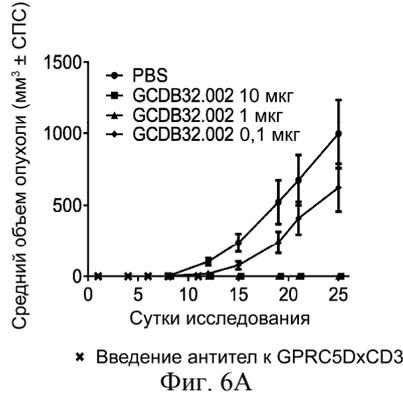


Фиг. 5А

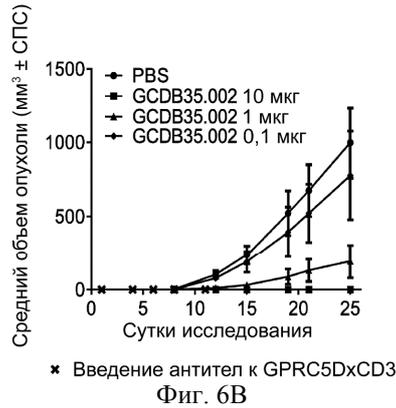
Клетки 293F-GPRC5D (яванского макака), блокатор Fc отсутствует (48 ч) Донор Т-клеток: M6521 (n = 1)



Фиг. 5В

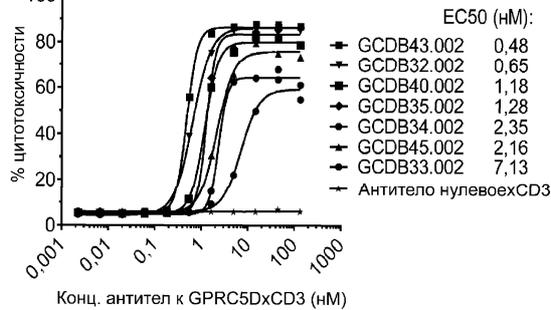


Фиг. 6А



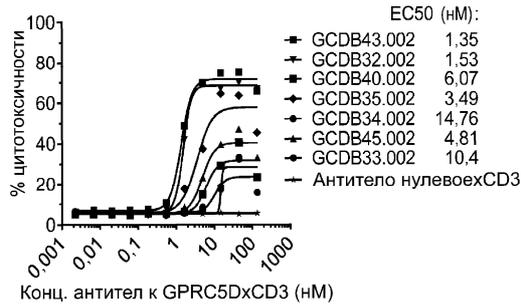
Фиг. 6В

Клетки H929; блокатор Fc отсутствует (48 ч)
Донор Т-клеток: M7077



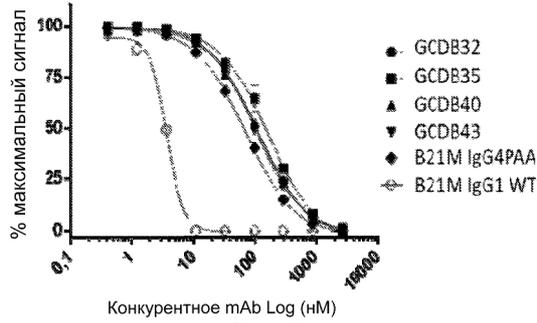
Фиг. 7А

Клетки H929; с блокатором Fc (48 ч)
 Донор Т-клеток: M7077



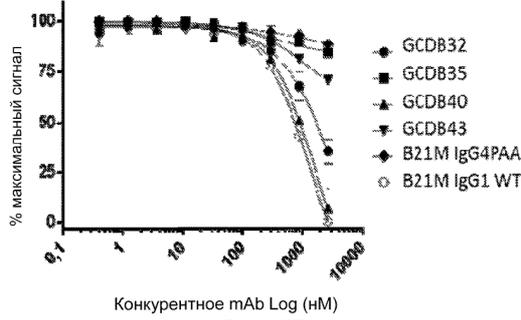
Фиг. 7В

FcγRI человека



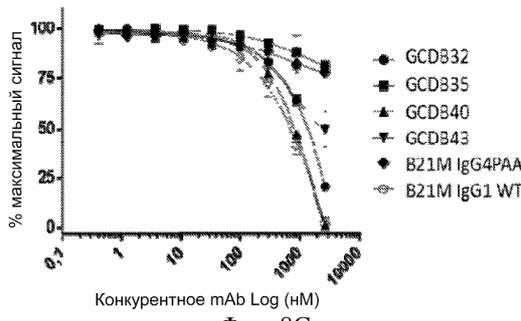
Фиг. 8А

FcγRIIa человека

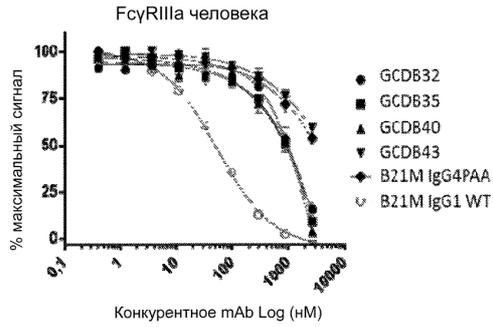


Фиг. 8В

FcγRIIb человека



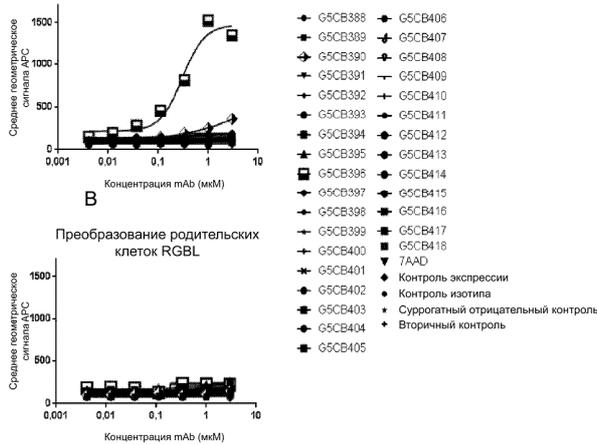
Фиг. 8С



Фиг. 8D

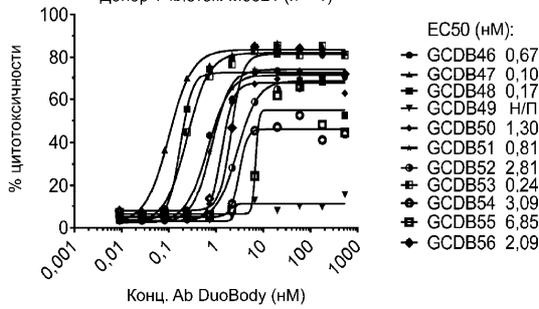
A

Преобразование клеток RBL GPRC5d



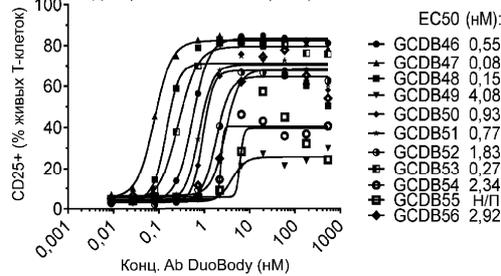
Фиг. 9

Клетки H929, блокатор Fc отсутствует (48 ч)
Донор Т-клеток: M6521 (n = 1)

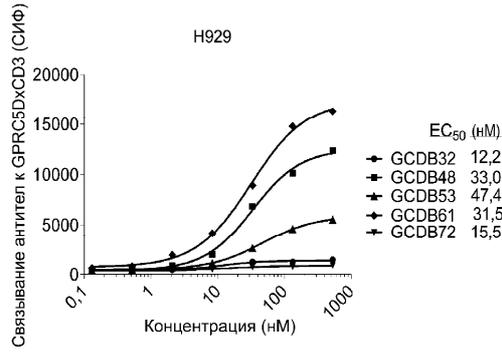


Фиг. 10А

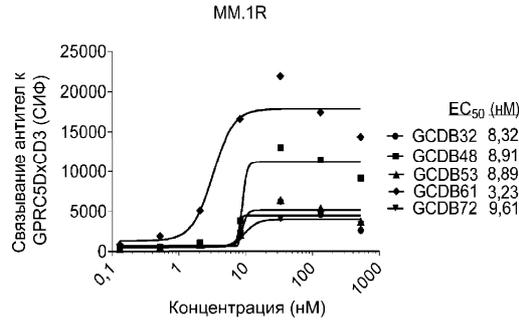
Клетки H929, блокатор Fc отсутствует (48 ч)
Донор Т-клеток: M6521 (n = 1)



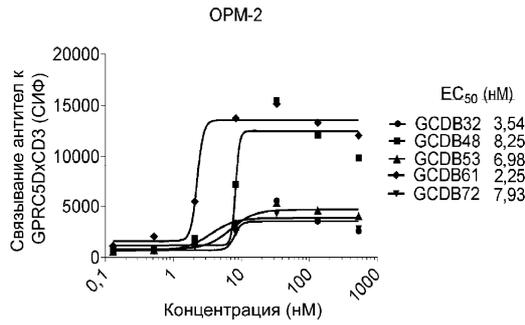
Фиг. 10В



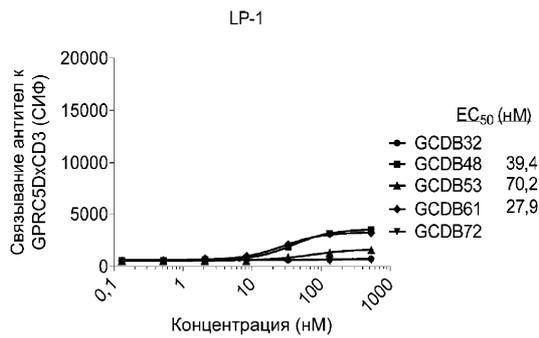
Фиг. 11А



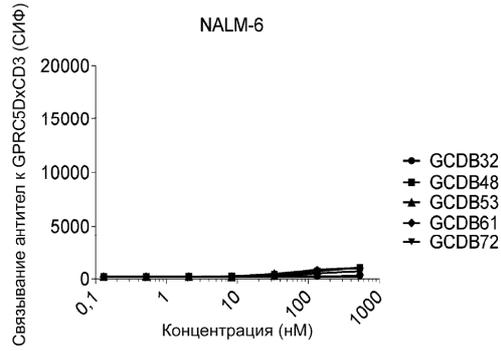
Фиг. 11В



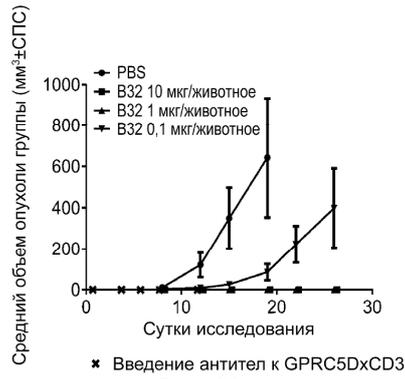
Фиг. 11С



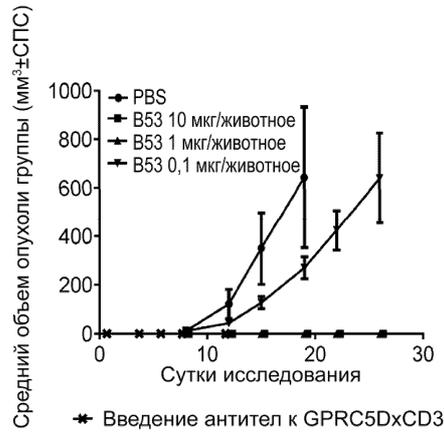
Фиг. 11D



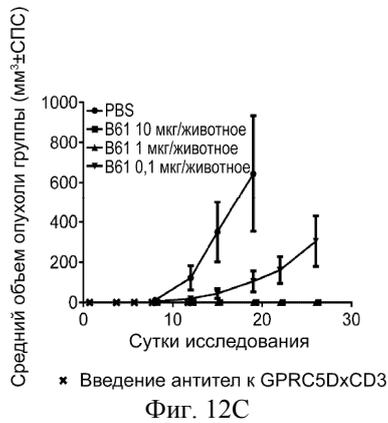
Фиг. 11Е



Фиг. 12А

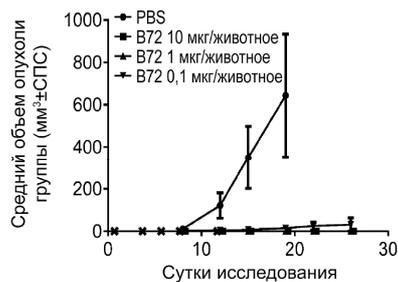


Фиг. 12В



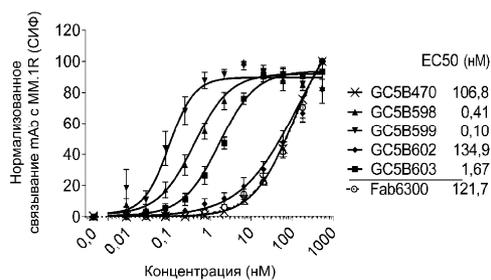
Фиг. 12С

044685



* Введение антител к GPRC5DхCD3

Фиг. 12D



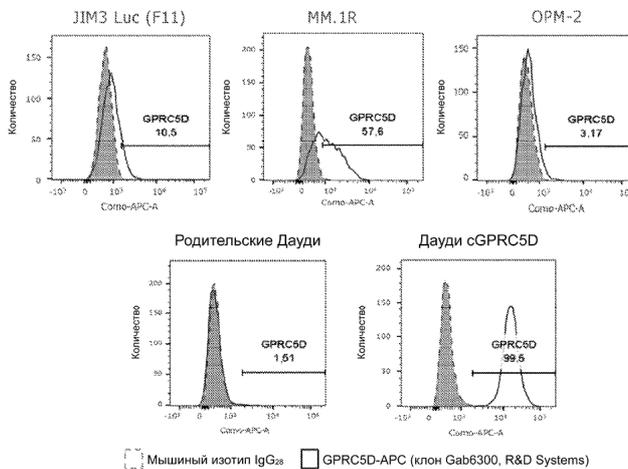
470 GC5M470.GC5B470.002
 610 GC5B598 (GC5M610)
 611 GC5B599 (GC5M611)
 614 GC5B602 (GC5M614)
 615 GC5B603 (GC5M615)

Концентрации антител:

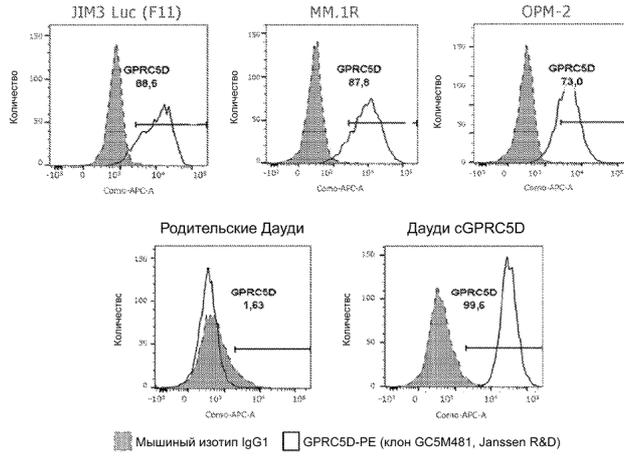
мкг/мл	0	0,0003	0,001	0,005	0,020	0,078	0,313	1,250	5,000	20,000	80,000
нМ	0	0,00020	0,008	0,032	0,130	0,520	2,078	8,313	33,250	133,000	532,000

Фиг. 13

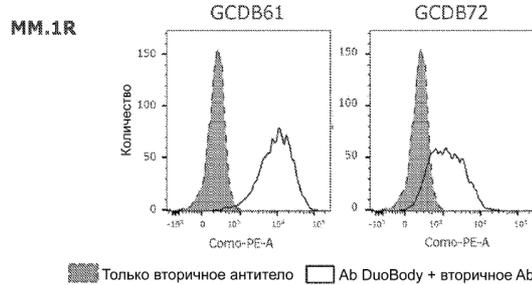
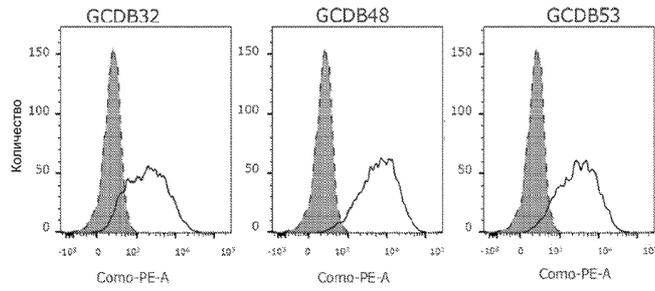
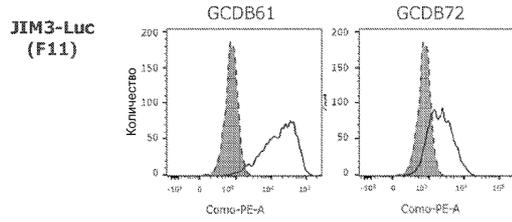
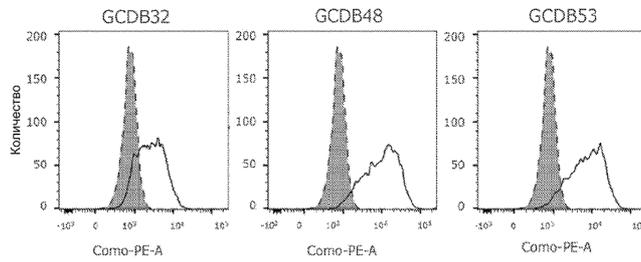
FAB6300

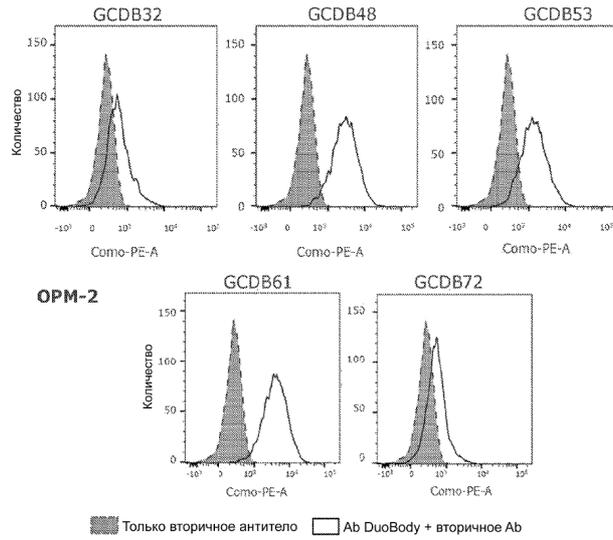


GC5M481

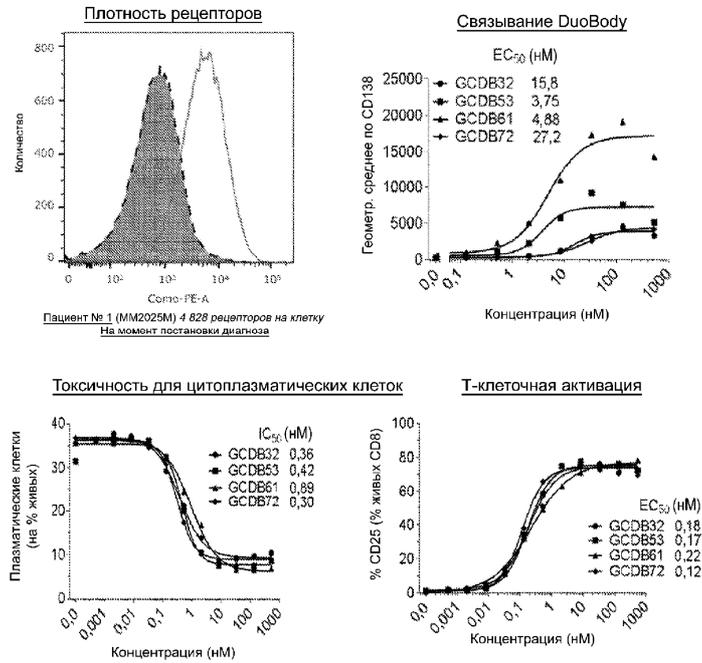


Фиг. 14А

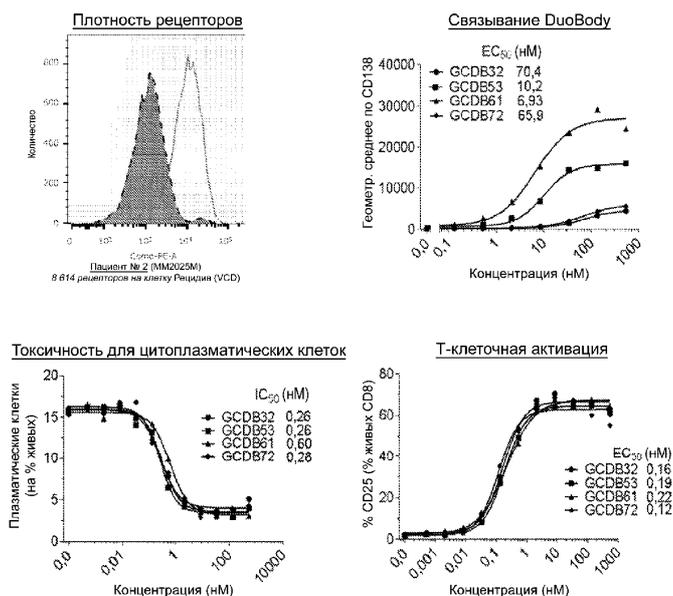




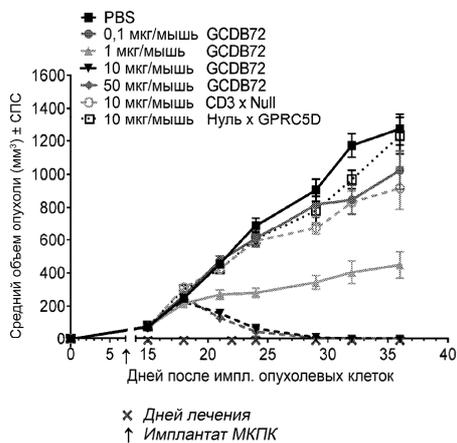
Фиг. 14В



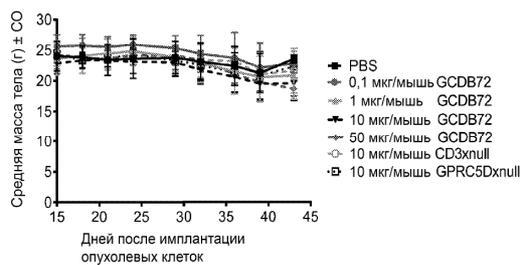
Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 16



Фиг. 17

