

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391920** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.09.22

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.05

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К GPRC5D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) PCT/CN2021/070314

(72) Изобретатель:

(32) 2021.01.05

Ли Жуньшэн, Хуан Вэньтао (CN)

(33) CN

(74) Представитель:

(86) PCT/CN2022/070287

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(87) WO 2022/148370 2022.07.14

(71) Заявитель:

ЛАНОВА МЕДИСИНЗ
ДИВЕЛОПМЕНТ КО., ЛТД. (CN)

(57) Представлены антитела или их фрагменты, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка GPRC5D человека. Антитела или их фрагменты способны нацеливаться на раковые клетки, экспрессирующие GPRC5D, и таким образом могут применяться для лечения рака, в частности гематологического рака.

A1

202391920

202391920

A1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К GPRC5D И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Представитель D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком (GPRC5D), является представителем семейства рецепторов, сопряженных с G-белком. 5 GPRC5D представляет собой трансмембранный белок. Сверхэкспрессия GPRC5D наблюдалась у пациентов с множественной миеломой. В частности, его высокая экспрессия характеризовалась значимой корреляцией с неблагоприятным исходом заболевания и лечения.

[0002] Учитывая его специфическую высокую экспрессию на клетках 10 злокачественных новообразований, было высказано предположение, что антитела, специфичные к GPRC5D, могут быть полезны для лечения злокачественного новообразования, например, с помощью биспецифического антитела, перенаправляющего T-клетки, или посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Антитела к GPRC5D, включая их гуманизированные производные, которые 15 обладают высокой аффинностью к белку GPRC5D человека, раскрыты в данном документе. Антитела или их фрагменты способны нацеливаться на раковые клетки, экспрессирующие GPRC5D, и таким образом могут применяться для лечения рака, в частности гематологического рака.

[0004] В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлено 20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка, представляющего собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D), при этом антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и 25 переменную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают: (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:29-34; (b) аминокислотные последовательности под 30 SEQ ID NO:42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54-59; или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:68-73.

[0005] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:29-34. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает 35 аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

последовательностей под SEQ ID NO:7 и 35-37, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:8 и 38-41. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38.

[0006] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:42-47. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:9 и 48-50, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:10 и 51-53. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:48, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51.

[0007] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54-59. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:61-64, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:16 и 65-67. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:63, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65.

[0008] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:68-73. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:1 и 74-79, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:2 и 80-86. В некоторых вариантах осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82. В некоторых вариантах

осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:77, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82.

5 [0009] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются ADCC-компетентными.

[0010] Также в некоторых вариантах осуществления представлено, что антитело или его фрагмент дополнительно содержат цитотоксическое лекарственное средство, конъюгированное с антителом или его фрагментом.

10 [0011] Также представлено биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к второму белку-мишени. В некоторых вариантах осуществления второй белок-мишень выбран из группы, состоящей из CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления второй белок-мишень представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления второй
15 белок-мишень представляет собой 4-1BB.

[0012] Также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела или его фрагмента по настоящему изобретению. Также предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий: (а) обработку Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) или макрофага *in vitro* антителом
20 или его фрагментом по настоящему изобретению, и (b) введение обработанной клетки пациенту.

[0013] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологический рак, такой как В-клеточный рак, при котором экспрессируется GPRC5D (например, множественная миелома).

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На **фиг. 1** показано связывание антител мыши, собранных из супернатанта гибридомы, с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

[0015] На **фиг. 2** показано связывание химерных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

30 [0016] На **фиг. 3** показано, что связывание антител индуцировало эндоцитоз.

[0017] На **фиг. 4** показано, что антитела были ADCC-компетентными.

[0018] На **фиг. 5-8** показаны результаты тестирования аффинности гуманизированных антител, происходящих из 6G10D9, 58F9G10, 34D3H1 и 37B9C4 соответственно.

[0019] На **фиг. 9** подтверждается связывание выбранных гуманизированных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках CHO-K1.

[0020] На **фиг. 10** подтверждается связывание выбранных гуманизированных антител с GPRC5D, экспрессированным на клетках NCI-H929.

5 [0021] На **фиг. 11** показана ADCC-эффективность протестированных гуманизированных антител.

[0022] На **фиг. 12** показана активность индукции интернализации у протестированных гуманизированных антител.

10 [0023] На **фиг. 13** показаны показатели активности в отношении уничтожения клеток у тестируемых конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[0024] На **фиг. 14** показаны показатели активности тестируемого антитела в отношении подавления опухоли.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

15 [0025] Следует отметить, что термин “объект” в формах единственного числа относится к одному или нескольким из этих объектов; например, “антитело” означает одно или несколько антител. В связи с этим формы единственного числа, выражения “один или несколько” и “по меньшей мере один” можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

20 [0026] Используемый в данном документе термин “полипептид” предназначен для охвата “полипептида” в единственном числе, а также “полипептидов” во множественном числе и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин “полипептид” относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не
25 привязан к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, “белок”, “аминокислотная цепь” или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение “полипептид”, и термин “полипептид” может использоваться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ними. Термин “полипептид” также предназначен для
30 обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, помимо прочего, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может происходить из природного биологического источника или быть получен с помощью
35 рекомбинантной технологии, но необязательно получен путем трансляции определенной

последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

[0027] “Гомология”, или “идентичность”, или “сходство” относится к сходству последовательностей между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Гомологию можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть выровнена для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или аминокислотой, то молекулы гомологичны в этом положении. Степень гомологии между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. “Неродственная” или “негомологическая” последовательность характеризуется менее чем 40% идентичностью, хотя предпочтительно менее чем 25% идентичностью, с одной из последовательностей по настоящему изобретению.

[0028] Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) характеризуются определенным процентом (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) “идентичности последовательности” с другой последовательностью, что означает, что при выравнивании этот процент оснований (или аминокислот) являются одинаковыми при сравнении двух последовательностей.

[0029] Термин “эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид” относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность, характеризующуюся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, которая характеризуется определенной степенью гомологии с ним или с его комплементом. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогично, “эквивалентный полипептид” относится к полипептиду, характеризующемуся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательности составляет по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид характеризуется наличием одного, двух, трех, четырех или пяти добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет

активность (например, эпитопсвязывающую) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

[0030] Используемые в данном документе термины “антитело” или “антигенсвязывающий полипептид” относятся к полипептиду или полипептидному комплексу, которые специфически распознают антиген и связываются с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь. Таким образом, термин “антитело” включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, который содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью, состоящей в связывании с антигеном. Их примеры включают без ограничения определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающую часть, переменную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасную область (FR) или любую ее часть или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[0031] Термины “фрагмент антитела” или “антигенсвязывающий фрагмент”, используемые в данном документе, представляют собой часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv и т. п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин “фрагмент антитела” включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин “фрагмент антитела” также включает любой синтетический или генно-инженерный белок, который действует как антитело, связываясь со специфическим антигеном с образованием комплекса.

[0032] “Одноцепочечный переменный фрагмент” или “scFv” относится к слитому белку, состоящему из переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом, состоящим из от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может быть обогащен глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность оригинального иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. scFv-молекулы известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

[0033] Термин антитело охватывает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Специалистам в данной области техники понятно, что тяжелые цепи подразделяются на классы гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами между ними (например, γ 1- γ 4). Именно природа этой цепи определяет то, к какому “классу” относится антитело – IgG, IgM, IgA, IgG или

IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, определяют функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы для специалиста в данной области техники в свете настоящего изобретения, и
5 соответственно они все входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов, безусловно, входят в объем настоящего изобретения, однако последующее обсуждение будет в целом направлено на класс IgG молекул иммуноглобулина. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой примерно 23000 Дальтон и
10 два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации “Y”, в которой легкие цепи прилегают к тяжелым цепям, начиная с устья “Y” и далее вдоль вариабельной области.

[0034] Антитела, их антигенсвязывающие полипептиды, варианты или производные согласно настоящему изобретению включают без ограничения поликлональные,
15 моноклональные, полиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидной связью (sdFv), фрагменты, содержащие либо домен VK, либо домен VH, фрагменты, продуцируемые библиотекой
20 экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к LIGHT-антителам, раскрытые в данном документе). Молекулы иммуноглобулина или антитела по настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подклассу молекул иммуноглобулина.

[0035] Легкие цепи относятся либо к классу каппа, либо к классу лямбда (K, λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана либо с легкой каппа-цепью, либо с легкой лямбда-цепью. Как правило, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а “хвостовые” части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными
25 дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины генерируются либо гибридомами, либо В-клетками, либо генно-инженерными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности расположены от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

[0036] Как легкая, так и тяжелая цепи разделены на области, обладающие структурной и функциональной гомологией. Термины “константный” и “вариабельный”
35 применяют в функциональном значении. В этом отношении следует понимать, что

вариабельные домены как легкой (VK), так и тяжелой (VH) частей цепи определяют распознавание антигена и специфичность. Наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) определяют важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецептором Fc, связывание комплемента и т. п. По соглашению нумерация доменов константной области увеличивается по мере их удаления от антигенсвязывающего сайта или amino-конца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а С-концевая часть представляет собой константную область; домены СН3 и СК фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепи соответственно.

10 [0037] Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связывать их. То есть домен VK и домен VH или подмножество определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, сайт связывания антигена определяется тремя CDR на каждой из цепей VH и VK (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, определенные молекулы иммуноглобулина происходят из видов верблюдовых или сконструированы на основе иммуноглобулинов верблюдовых, при этом полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

25 [0038] Во встречающихся в природе антителах шесть “определяющих комплементарность областей” или “CDR”, присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, несмежные последовательности аминокислот, которые позиционируются конкретным образом с образованием антигенсвязывающего домена при приобретении антителом своей трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые “каркасными” областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные области в значительной степени принимают конформацию β -слоя, а CDR образуют петли, которые соединяют структуру β -слоя, а в некоторых случаях составляют ее часть. Таким образом, функцией каркасных областей является образование остова, который обеспечивает позиционирование CDR в правильной ориентации с помощью нековалентных взаимодействий между цепями. Антиген-связывающий домен, образованный позиционированными CDR, определяет 30 поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта

комплементарная поверхность содействует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Аминокислоты, содержащие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они
 5 были точно определены (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0039] В случае, если существует два или более определения термина, применяемого и/или принятого в данной области техники, определение термина, используемое в данном
 10 документе, подразумевает включение всех таких значений, если явно не указано обратное. Конкретным примером является использование термина “определяющая комплементарность область” (“CDR”) для описания несмежных сайтов связывания антигена, находящихся в вариабельной области как тяжелой, так и легкой цепи полипептидов. Эта конкретная область была описана Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and
 15 Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983), и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определения CDR по Kabat и Chothia предусматривают перекрывание подмножеств аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение одного из двух определений для обозначения
 20 CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, как определяется и применяется в данном документе. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из цитированных выше ссылок, представлены в таблице ниже в качестве сравнения. Точное число остатков, охватываемых конкретным CDR, будет варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR.
 25 Специалисты в данной области техники могут обычным образом определить, какие остатки составляют конкретный CDR, с учетом аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0040] Kabat и соавторы также определили систему нумерации последовательностей переменного домена, которую можно применять к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему “нумерации по Kabat” к любой последовательности переменного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Используемый в данном документе термин “нумерация по Kabat” относится к системе нумерации, установленной Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

[0041] В дополнение к таблице выше, система присвоения номеров по Kabat описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается с примерно аминокислоты 31 (т. е. примерно через 9 остатков после первого остатка цистеина), содержит примерно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка от конца CDR-H1, содержит примерно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается с примерно тридцать третьего аминокислотного остатка от конца CDR-H2; содержит 3-25 аминокислот и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается с примерно остатка 24 (т. е. после остатка цистеина); содержит примерно 10-17 остатков и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается с примерно шестнадцатого остатка от конца CDR-L1 и содержит примерно 7 остатков. CDR-L3 начинается с примерно тридцать третьего остатка после конца CDR-L2 (т. е. после остатка цистеина); содержит примерно 7-11 остатков и заканчивается последовательностью F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0042] Описанные в данном документе антитела могут происходить от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В другом варианте осуществления переменная область может происходить от хрящевых рыб (например, от акул).

[0043] Используемый в данном документе термин “константная область тяжелой цепи” включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из следующих доменов: домен СН1, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен СН2, домен СН3 или их вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую

домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В другом варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Дополнительно, в антителе для применения по настоящему изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть домена СН2 (например, весь домен СН2 или его часть). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что она будет отличаться по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

[0044] Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, может происходить из различных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

[0045] Используемый в данном документе термин “константная область легкой цепи” включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один константный домен каппа или константный домен лямбда.

[0046] “Пара легкая цепь-тяжелая цепь” относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между доменом СL легкой цепи и доменом СН1 тяжелой цепи.

[0047] Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны. Используемый в данном документе термин “домен VH” предусматривает amino-концевой переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин “домен СН1” включает первый (наиболее близкий к amino-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен СН1 примыкает к домену VH и является amino-концевым по отношению к шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

[0048] Используемый в данном документе термин “домен CH2” предусматривает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от приблизительно остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании общепринятых схем нумерации (остатки от 244 до 360, система нумерации по Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. 5 Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983). Домен CH2 уникален тем, что он не образует тесную пару с другим доменом. Наоборот, две N-сцепленные разветвленные углеводные цепи размещены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также получено убедительное документальное подтверждение, что домен CH3 продолжается от домена CH2 до С-конца 10 молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

[0049] Используемый в данном документе термин “шарнирная область” предусматривает часть тяжелой цепи молекулы, которая присоединяет домен CH1 к домену CH2. Эта шарнирная область содержит примерно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. 15 Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

[0050] Используемый в данном документе термин “дисульфидная связь” предусматривает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать 20 дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

[0051] Используемый в данном документе термин “химерное антитело” будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из 25 второго вида. В определенных вариантах осуществления область или сайт связывания мишени будут происходить из источника, отличного от человека (например, от мыши или примата), а константная область является человеческой.

[0052] Как используется в данном документе, “процент гуманизации” рассчитывается путем определения количества различий аминокислот каркаса (т. е. различий, не относящихся к CDR) между гуманизированным доменом и доменом

зародышевой линии, вычитания этого числа из общего количества аминокислот, а затем деления его на общее количество аминокислот и умножения на 100.

[0053] Под “специфически связывается” или “обладает специфичностью к” обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением говорят, что антитело “специфически связывается” с эпитопом, если оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена лучше, чем если бы оно связывалось со случайным, не родственным ему эпитопом. Термин “специфичность” используется в данном документе для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело “А” характеризуется более высокой специфичностью в отношении данного эпитопа, чем антитело “В”, или можно сказать, что антитело “А” связывается с эпитопом “С” с более высокой специфичностью, чем та, которой оно характеризуется в отношении родственного эпитопа “D.”

[0054] Используемые в данном документе термины “лечить” или “лечение” относятся как к терапевтическому лечению, так и к мерам профилактики или предупреждения, целью которых является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирующее раку. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают без ограничения уменьшение выраженности симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизированное (т. е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), независимо от того, поддается ли обнаружению или нет. “Лечение” также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. К нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже есть состояние или нарушение, а также тех, кто предрасположен к состоянию или нарушению, или тех, у кого нужно предупредить развитие состояния или нарушения.

[0055] Под “субъектом”, или “индивидуумом”, или “животным”, или “пациентом”, или “млекопитающим” подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого требуется постановка диагноза, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и зоопарковых, спортивных животных или домашних

питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[0056] Используемые в данном документе выражения, такие как “пациенту, нуждающемуся в лечении” или “субъекту, нуждающемуся в лечении”, включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, у которых введение антитела или композиции по настоящему изобретению может обеспечить благоприятный эффект, например, для обнаружения, для диагностической процедуры и/или для лечения.

Антитела к GPRC5D

[0057] При использовании гибридной технологии в прилагаемых экспериментальных примерах показано, что был получен ряд антител мыши. Секвенировали четырнадцать антител мыши и получили гуманизированные антитела. Эти гуманизированные антитела проявляли мощную GPRC5D-связывающую активность и были способны индуцировать опосредованный рецептором эндоцитоз. Тестирование *in vivo* показало, что эти антитела активно индуцируют ADCC и подавляют развитие опухоли.

[0058] Четыре антитела мыши, 34D3H1, 37B9C4, 58F9G10 и 6G10D9, прошли процесс гуманизации. Некоторые гуманизированные антитела, включая 6-H3L3, 6-H4L3 (оба происходят из 6G10D9), 58-H1L1, 58-H3L1 (оба происходят из 58F9G10), 34-H1L1 (происходит из 34D3H1) и 37-H1L1 (происходит из 37B9C4), дополнительно показали перспективность продолжения клинической разработки.

[0059] Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения представлены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка, представляющего собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPRC5D). Антитело или его фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

[0060] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34; (b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59 или SEQ ID NO: 54, 60 и 56-59; или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73.

[0061] В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под

SEQ ID NO:7 и 35-37 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью любой из последовательностей под SEQ ID NO:7 и 35-37. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO:8 и 38-41 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью любой из последовательностей под SEQ ID NO:8 и 38-41.

[0062] В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:35. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:38.

[0063] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38.

[0064] В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:42-47. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под SEQ ID NO: 9 и 48-50, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 9 и 48-50. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO:10 и 51-53 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью любой из последовательностей под SEQ ID NO:10 и 51-53.

[0065] В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:48 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:48. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:51.

[0066] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:48, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51.

[0067] В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54-59. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под SEQ ID NO: 61-64, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 61-64. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO: 16 и 65-67, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 16 и 65-67.

[0068] В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:61. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:65.

[0069] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:61, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65.

[0070] В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:63 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:63. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65 или

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:65.

[0071] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:63, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:65.

[0072] В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54, 60, и 56-59. Примеры последовательностей для VH включают последовательность под SEQ ID NO: 15 или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную последовательности под SEQ ID NO: 15. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO: 16 и 65-67, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 16 и 65-67.

[0073] В одном варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73. Примеры последовательностей для VH включают последовательности под SEQ ID NO: 1 и 74-79, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 1 и 74-79. Примеры последовательностей для VL включают последовательности под SEQ ID NO: 2 и 80-86, или последовательность, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичную любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2 и 80-86.

[0074] В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:76. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:82.

[0075] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены

антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:76, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82.

5 **[0076]** В одном варианте осуществления VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:77 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:77. В одном варианте осуществления VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82 или
10 последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности в отношении последовательности под SEQ ID NO:82.

[0077] Также в некоторых вариантах осуществления представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом на FAP α , что и любое из этих антител. Также в некоторых вариантах осуществления представлены
15 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с FAP α , например, антитело, содержащее VH, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:77, и VL, которая предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:82.

[0078] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент являются
20 ADCC-компетентными. Способы и материалы, подходящие для получения ADCC-компетентного антитела, известны из уровня техники, такие как с использованием соответствующих Fc-фрагментов или путем уменьшения/удаления фукозилирования.

[0079] В некоторых вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают: (a) аминокислотные
25 последовательности под SEQ ID NO:29-34; (b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:42-47; (c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54-59 или SEQ ID NO:54, 60 и 56-59 или (d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:68-73, где каждая из приведенных последовательностей CDR содержит одну, две или три консервативные аминокислотные замены.

30 **[0080]** “Консервативная аминокислотная замена” представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, содержащим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая
35 кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин,

серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, несущественный

5 аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть заменена структурно сходной нитью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[0081] Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен

10 представлены в таблице ниже, где показатель сходства 0 или выше указывает на то, что замена этих двух аминокислот друг другом является консервативной.

Таблица А. Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица В. Консервативные замены аминокислот

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0082] Специалисту в данной области техники также будет понятно, что описанные в данном документе антитела могут быть модифицированы таким образом, что они будут отличаться по аминокислотной последовательности от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они были получены. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из указанного белка, может быть сходной, например характеризоваться определенной процентной идентичностью исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной исходной последовательности.

[0083] В некоторых вариантах осуществления антитела к CCR8 представляют собой модифицированные mAb, содержащие модифицированную константную область тяжелой цепи, такую как афукозилированная тяжелая цепь, которая с более высокой аффинностью связывается с активирующим рецептором Fc γ , который опосредует усиление ADCC, по

сравнению с немодифицированным mAb. В некоторых вариантах осуществления антитела к CCR8 содержат тяжелую цепь, которая происходит из варианта IgG1 человека, которая содержит одну L234Y, L235Q, G236W, S239D/M, F243L, H268D, D270E, R292P, S298A, Y300L, V305I, K326D, A330L/M, I332E, K334A/E, P396L или их комбинацию, что
5 обеспечивает усиление функции ADCC (вся нумерация EU).

[0084] В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность или одну или несколько частиц, которые обычно не ассоциированы с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело по настоящему изобретению может содержать гибкую линкерную
10 последовательность или может быть модифицировано для добавления функциональной частицы (например, PEG, лекарственного средства, токсина или метки).

[0085] Антитела, их варианты или производные по настоящему изобретению включают производные, которые модифицированы, т. е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не
15 препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например без ограничения антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с
20 клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с помощью известных методик, включая без ограничения специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, антитела могут содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

[0086] GPRC5D сверхэкспрессируется на определенных злокачественных гематологических клетках, таких как клетки множественной миеломы. Таким образом, антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться для нацеливания
25 на эти злокачественные клетки для их подавления, инактивации или разрушения. В одном примере антитело или его фрагмент конъюгированы со средством, которое помогает подавлять, инактивировать или разрушать злокачественную клетку. В данном документе
30 показано, что антитела способны индуцировать эндоцитоз, опосредованный GPRC5D.

[0087] В некоторых вариантах осуществления антитела или фрагменты могут быть конъюгированы с терапевтическими средствами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа,
35 фармацевтическими средствами или PEG. В некоторых вариантах осуществления

конъюгированное средство может представлять собой короткую интерферирующую РНК (siRNA) или природный модулятор, такой как агонист стимулятора генов интерферона (STING) или агонист TLR7/8.

[0088] В одном варианте осуществления антитела или фрагменты по настоящему изобретению ковалентно присоединены к частице лекарственного средства. Частица лекарственного средства может представлять собой группу, реагирующую с точкой конъюгации на антителе, или может быть модифицирована для включения таковой. Например, частица лекарственного средства может быть присоединена путем алкилирования (например, по эpsilon-аминогруппе остатков лизина или N-концу антител), восстановительного аминирования окисленного углевода, переэтерификации между гидроксильными и карбоксильными группами, амидированием по аминогруппам или карбоксильным группам и конъюгации с тиолами.

[0089] В некоторых вариантах осуществления число частиц лекарственного средства, r , конъюгированных на молекулу антитела, находится в диапазоне в среднем от 1 до 8; от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления r находится в диапазоне в среднем от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления r в среднем составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления r находится в диапазоне в среднем от приблизительно 1 до приблизительно 20, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6, от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1 до приблизительно 4, от приблизительно 1 до приблизительно 3 или от приблизительно 1 до приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления r находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 7, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 5, от приблизительно 2 до приблизительно 4 или от приблизительно 2 до приблизительно 3.

[0090] Например, если химическая активация белка приводит к образованию свободных тиольных групп, белок может быть конъюгирован с сульфгидрильным реагирующим средством. В одном аспекте средство представляет собой средство, который существенно специфичен в отношении свободных тиольных групп. Такие средства включают, например, малеимид, галогенацетамиды (например, с йодом, бромом или хлором), сложные эфиры галогенов (например, йода, брома или хлора),

галогенметилкетоны (например, с йодом, бромом или хлором), бензилгалогениды (например, йодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио.

[0091] Лекарство может быть связано с антителом или фрагментом с помощью линкера. Подходящие линкеры включают, например, расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Расщепляемый линкер обычно подвержен расщеплению во внутриклеточных условиях. Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, такой как лизосомальная протеаза или эндосомальная протеаза. В примерах вариантов осуществления линкер может представлять собой дипептидный линкер, такой как валин-цитруллиновый (val-cit), фенилаланин-лизиновый (phe-lys) линкер или малеимидокапроно-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонилловый (mc-Val-Cit-PABA) линкер. Другой линкер представляет собой сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (smcc). Конъюгация сульфо-smcc происходит посредством малеимидной группы, которая реагирует с сульфгидрилами (тиолами, -SH), тогда как ее сложный эфир сульфо-NHS является реактивным в отношении первичных аминов (таких, как находящиеся в лизине и N-конце белка или пептида). Еще одним линкером является малеимидокапроил (mc). Другие подходящие линкеры включают линкеры, гидролизующиеся при определенном pH или диапазоне pH, такие как гидразоновый линкер. Дополнительные подходящие расщепляемые линкеры включают дисульфидные линкеры. Линкер может быть ковалентно связан с антителом до такой степени, что антитело должно подвергаться внутриклеточной деградации для высвобождения лекарственного средства, например, линкер mc и т.п.

[0092] Линкер может содержать группу для связывания с антителом. Например, линкер может содержать амино-, гидроксильную, карбоксильную или сульфгидрильную реакционноспособную группу (например, малеимид, галогенацетамиды (например, с йодом, бромом или хлором), галоидэфиры (например, с йодом, бромом или хлором), галогенметилкетоны (например, с йодом, бромом или хлором), бензилгалогениды (например, йодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио).

[0093] В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства представляет собой цитотоксическое или цитостатическое средство, иммунодепрессант, радиоизотоп, токсин или т. п. Конъюгат можно использовать для подавления размножения опухолевой клетки или раковой клетки, вызывая апоптоз в опухолевой или раковой клетке или для лечения рака у пациента. Соответственно, конъюгат можно использовать в различных условиях для лечения форм рака у животных. Конъюгат можно использовать для доставки лекарственного средства к опухолевой или раковой клетке. Не ограничиваясь какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления конъюгат связывается или

ассоциируется с раковой клеткой, экспрессирующей GPRC5D, и конъюгат и/или лекарственное средство могут проникать внутрь опухолевой или раковой клетки посредством опосредованного рецептором эндоцитоза.

[0094] Оказавшись внутри клетки, одна или несколько специфических пептидных последовательностей в конъюгате (например, в линкере) гидролитически расщепляются одной или несколькими протеазами, ассоциированными с опухолевыми клетками или с раковыми клетками, что приводит к высвобождению лекарственного средства. Затем высвобожденное лекарственное средство может свободно мигрировать внутри клетки и индуцировать цитотоксическую, цитостатическую или другие виды активности. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство отщепляется от антитела вне опухолевой или раковой клетки, и впоследствии лекарственное средство проникает в клетку или действует на клеточной поверхности.

[0095] Примеры частиц лекарственного средства или вариантов нагрузки выбраны из группы, состоящей из DM1 (майтанин, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанин), mc-MMAD (6-малеимидокапроил-монометилауристатин-D или N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-2-метокси-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[[[(1S)-2-фенил-1-(2-тиазолил)этил]амино]пропил]-1-пирролидинил]-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-(9C1)-L-валинамид), mc-MMAF (малеимидокапроил-монометилауристатин F или N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-N-метил-L-валил-L-валил-(3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламино)гептаноил-(α R, β R,2S)- β -метокси- α -метил-2-пирролидинпропаноил-L-фенилаланин) и mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-малеимидокапроил-ValcCit-(p-аминобензилоксикарбонил)-монометилауристатин E или N-[[[4-[[N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-L-валил-N5-(аминокарбонил)-L-орнитил]амино]фенил]метокси]карбонил]-N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-гидрокси-1-метил-2-фенилэтил]амино]-1-метокси-2-метил-3-оксопропил]-1-пирролидинил]-2-метокси-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-L-валинамид). DM1 является производным ингибитора тубулина мйтанина, тогда как MMAD, MMAE и MMAF являются производными ауристатина. В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства выбрана из группы, состоящей из mc-MMAF и mc-Val-Cit-PABA-MMAE. В некоторых вариантах осуществления частица лекарственного средства представляет собой мйтаниноид или ауристатин.

[0096] Антитела или фрагменты могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим средством, которое может предусматривать обнаруживаемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятором, гормоном, ферментом,

олигонуклеотидом, фотоактивным терапевтическим или диагностическим средством, цитотоксическим средством, которое может представлять собой лекарственное средство или токсин, средством, усиливающим воздействие ультразвука, нерадиоактивной метки, их комбинацией и другими подобными средствами, известными в данной области техники.

5 **[0097]** Антитела могут быть помечены обнаруживаемой меткой путем связывания их с хемилюминесцентным соединением. Присутствие антигенсвязывающего полипептида с хемилюминесцентной меткой затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами особенно применимых соединений для хемилюминесцентного мечения являются люминол, изолюминол, сложный ароматический эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир оксалата.

10 **[0098]** Антитела также могут быть помечены обнаруживаемой меткой с использованием испускающих флуоресценцию металлов, таких как ^{152}Eu или других из ряда лантанидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких металлохелатирующих групп, как диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA). Методики конъюгирования различных частиц с антителом хорошо известны, см., например, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy” в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery” в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy” в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Бифункциональные молекулы и комбинированная терапия

15 **[0099]** GPRC5D сверхэкспрессируется на определенных злокачественных гематологических клетках, таких как клетки множественной миеломы. Таким образом, антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться для нацеливания на эти злокачественные клетки для их подавления, инактивации или разрушения. В некоторых вариантах осуществления представлена бифункциональная или биспецифическая молекула/антитело, которая нацеливается как на белок GPRC5D, так и на иммунную клетку.

[0100] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и мастоцита. Молекулы на иммунной клетке, на которые может осуществляться нацеливание, включают, например, 5 CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 и 4-1BB (также известный как CD137). Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и CD47. Конкретные примеры биспецифичности 10 включают без ограничения GPRC5D/CD3.

[0101] Также представлены различные форматы биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления каждый из фрагмента, специфического в отношении PD-L1, и второго фрагмента независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного 15 переменного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[0102] В настоящем изобретении также представлены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, их варианты или производные по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут 20 кодировать полные переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида. Кроме того, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же 25 молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида.

[0103] Способы создания антител хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления как переменная, так и константная области антигенсвязывающих полипептидов по настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела 30 могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и описанных в данном документе. Например, полностью человеческие антитела к конкретному антигену можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано с обеспечением получения таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которого были дезактивированы. 35 Примеры методик, которые можно использовать для получения таких антител, описаны в

патентах США 6150584, 6458592, 6420140, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы лечения

5 **[0104]** Как описано в данном документе, антитела, варианты или производные по настоящему изобретению можно использовать в определенных способах лечения и диагностики.

10 **[0105]** Настоящее изобретение дополнительно направлено на варианты терапии на основе антител, которые предусматривают введение антител по настоящему изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или нескольких нарушений или состояний, описанных в данном документе. Терапевтические соединения по настоящему изобретению включают без ограничения антитела по настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в данном документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению (включая их варианты и производные, как описано в данном документе).

15 **[0106]** Антитела по настоящему изобретению также можно использовать для лечения или подавления рака. Как представлено выше, GPRC5D может сверхэкспрессироваться в раковых клетках, в частности, в клетках множественной миеломы. Было показано, что ингибирование GPRC5D является применимым для лечения форм рака.

20 **[0107]** Соответственно, в некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления способ включает введение пациенту эффективного количества антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из раковых клеток у пациента сверхэкспрессирует GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент является ADCC-компетентными. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент дополнительно содержит цитотоксическое средство. В некоторых вариантах осуществления антитело является биспецифическим, при этом оно дополнительно нацеливается на иммунную клетку, такую как цитотоксическая Т-клетка.

30 **[0108]** В настоящем изобретении также представлены варианты клеточной терапии, такие как варианты терапии на основе Т-клеток (или НК-клеток, макрофагов) с химерным антигенным рецептором (CAR). Можно применять подходящую клетку, которая приводится в контакт с антителом к GPRC5D по настоящему изобретению (или, альтернативно, сконструирована с обеспечением экспрессии антитела к GPRC5D по

настоящему изобретению). После такого контакта или конструирования клетка может затем быть введена пациенту с раком, нуждающемуся в лечении. У пациента с раком может иметься рак любого из описанных в данном документе типов. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, без ограничения инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), макрофаг или их комбинацию.

5 [0109] В некоторых вариантах осуществления клетка была выделена из организма самого пациента с раком. В некоторых вариантах осуществления клетка была предоставлена донором или из банка клеток. Если клетка выделена из организма пациента
10 с раком, нежелательные иммунные реакции могут быть минимизированы.

[0110] Неограничивающие примеры форм рака включают гематологические формы рака, такие как множественная миелома. Другие примеры включают варианты лейкоза (включая варианты острого лейкоза (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный,
15 миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз)) и варианты хронического лейкоза (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), и варианты лимфомы (например, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома), и множественную миелому.

[0111] Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента
20 будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их варианты или производные, возраст пациента, вес тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания, а также время введения, скорость выведения, комбинацию препаратов и тяжесть конкретного заболевания, которое лечат. Оценка таких факторов лицами, осуществляющими уход, находится в рамках обычной квалификации в данной области
25 техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, пути введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

30 [0112] Способы введения антител, вариантов включают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или слизисто-кожные
35 выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки

и кишечника и т. д.), и их можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды по настоящему изобретению, можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацистеально, интравагинально, 5 внутривнутрибрюшинно, наружно (в виде порошков, мазей, капель или чрескожных пластырей), трансбуккально или в виде пероральных или назальных спреев.

[0113] Термин “парентеральный”, используемый в данном документе, относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, 10 внутривнутрибрюшинную, интратермальную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

[0114] Введение может быть системным или местным. Кроме того, может требоваться введение антител по настоящему изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и подоболочечную 15 внутрижелудочковую инъекцию; при этом внутрижелудочковая инъекция может осуществляться с помощью внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Оммая. Также можно применять ингаляционное введение, например путем применения ингалятора или распылителя и состава с аэрозольным средством.

[0115] Может требоваться местное введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций по настоящему изобретению в область, нуждающуюся в лечении; это 20 может быть достигнуто, например без ограничения местной инфузией во время операции, наружным применением, например в сочетании с перевязкой после операции, инъекцией, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, при этом указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны или волокна из силикона. Предпочтительно при 25 введении белка, включая антитело, по настоящему изобретению необходимо соблюдать осторожность и использовать материалы, на которых белок не абсорбируется.

[0116] Количество антител по настоящему изобретению, которое будет эффективным для лечения, подавления и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, нарушения или состояния, можно определить с 30 помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для определения оптимального диапазона дозировок могут использоваться анализы *in vitro*. Точная доза, которая будет использоваться в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания, нарушения или состояния и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и особенностями каждого пациента. Эффективные дозы можно

экстраполировать из кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью тест-систем *in vitro* или в модельных животных.

[0117] Как правило, вводимая пациенту дозировка антигенсвязывающих полипептидов по настоящему изобретению обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг веса тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг веса тела пациента. Как правило, антитела человека характеризуются более продолжительным временем полужизни в организме человека, чем антитела из других видов вследствие иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, во многих случаях возможно применение более низких дозировок антител человека и меньшая частота введения. Дополнительно, дозировка и частота введения антител по настоящему изобретению могут быть снижены за счет усиления поглощения антител и их проникновения в ткани (например, в головной мозг), обеспечиваемых модификациями, такими как, например, липидирование.

[0118] В дополнительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые можно вводить с композициями по настоящему изобретению, включают без ограничения IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, средство, специфическое в отношении CD40, CD40L, и TNF- α .

[0119] В дополнительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению вводят в сочетании с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, лучевая терапия.

Способы диагностики

[0120] Сверхэкспрессия GPRC5D наблюдается в определенных образцах опухолей, и пациенты, у которых имеются клетки со сверхэкспрессией GPRC5D, вероятно, будут восприимчивыми к лечению антителами к GPRC5D по настоящему изобретению. Соответственно, антитела по настоящему изобретению также можно использовать для диагностических и прогностических целей.

[0121] Образец, который предпочтительно предусматривает клетку, может быть получен из организма пациента, который может представлять собой пациента с раком или пациента, которому требуется постановка диагноза. Клетка представляет собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца из организма пациента. После необязательной предварительной обработки образца образец можно инкубировать с антителом по настоящему изобретению в условиях, позволяющих антителу взаимодействовать с белком GPRC5D, потенциально присутствующим в образце.

Для обнаружения присутствия белка GPRC5D в образце можно использовать такие способы, как ELISA, используя преимущество антитела к GPRC5D.

[0122] Присутствие белка GPRC5D в образце (необязательно с указанием количества или концентрации) можно использовать для диагностики рака, в качестве индикатора того, что пациент подходит для лечения антителом, или в качестве индикатора того, что пациент ответил (или нет) на лечение рака. В случае прогностического способа обнаружение может быть выполнено один, два или больше раз на определенных стадиях после начала лечения рака для определения прогресса лечения.

Композиции

10 [0123] В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит второе противораковое средство (например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа).

15 [0124] В конкретном варианте осуществления термин “фармацевтически приемлемый” означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у человека. Дополнительно, “фармацевтически приемлемый носитель” обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное средство для составления любого типа.

[0125] Термин “носитель” относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мед, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п. Если это требуется, композиция может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферизующих средств для регулирования pH, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты.

Также предусмотрены антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут
5 иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Композицию также можно составлять в виде суппозитория с традиционными связывающими средствами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза,
10 карбонат магния и т. д. фармацевтического качества. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences E.W. Martin, включенной в данный документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с носителем в количестве, подходящем для
15 обеспечения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0126] В одном варианте осуществления композиция составлена в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для
20 внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также содержать солюбилизующее средство и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты доставляются либо по отдельности, либо в виде смеси друг с другом
25 в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть помещена в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической чистоты или физиологический
30 раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

[0127] Соединения по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли,
35 образованные с анионами, такие как производные соляной, фосфорной, уксусной,

щавелевой, винной кислот и т. д., и соли, образованные с катионами, такие как производные натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. д.

ПРИМЕРЫ

5 Пример 1. Получение моноклональных антител мыши к GPRC5D человека

[0128] Белок GPRC5D человека использовали для иммунизации различных линий мышей и соответственно получали гибридомы. Для дальнейшего анализа было собрано более двадцати клонов гибридом.

[0129] Антитела, собранные из супернатантов гибридом, тестировали в отношении их связывания с белком GPRC5D человека, экспрессированным на клетках CHO K1. Клетки CHO-K1, стабильно экспрессирующие GPRC5D человека, собирали из колб. По 100 мкл клеток в количестве 1×10^6 клеток/мл инкубировали с антителами мыши в 3-кратных серийных разведениях в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с помощью 200 мкл буфера FACS клетки инкубировали со вторичным антителом в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл буфера FACS, переносили в пробирку BD Falcon вместимостью 5 мл и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что антитела мыши могут связываться с GPRC5D человека с высокой EC50 (фиг. 1). Результаты представлены в таблице ниже. Все они проявляли хорошую связывающую активность.

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
2D3C12	46110	835137	0,4535	1,132	2,841	789027
6G10D9	6870	1429638	0,9116	0,9535	8,159	1422768
11C1H10	40235	859162	0,5274	1,101	3,368	818927
14C2A11C6	5573	728662	0,9934	0,8801	9,849	723089
14C2F7C6	15616	751279	0,9634	0,9615	9,193	735663
14F3H2	20428	872785	0,8744	1,146	7,489	852357
21C3C11B3	57013	1508205	0,6538	1,1	4,506	1451192
26E1D12	52742	677713	0,2246	1,303	1,677	624970
29A7H11B9D	71394	1385928	0,4219	1,259	2,642	1314534
3						
29A7H11H4C	43439	1461931	0,7377	1,109	5,466	1418492
12						

29B2C10	68634	1607305	0,6201	1,305	4,17	1538671
31H11C10H7	16791	961550	0,9534	1,134	8,983	944759
34D3F8B5	-16109	1407656	1,084	0,7475	12,12	1423765
34D3H1	-13314	1412131	0,8843	0,8042	7,662	1425446
34D4A10	2737	921851	1,019	0,8496	10,44	919114
36F11E9H3	13852	766682	0,8732	1,087	7,468	752830
37B9C4	10880	1758861	0,5917	0,9933	3,906	1747981
38A10E9A11	24016	1785041	0,9472	1,099	8,854	1761025
39D2B6	7833	1774093	0,5469	0,98	3,523	1766260
40A5B2	25394	1196144	0,5108	0,9236	3,242	1170750
57G11D4A10	-22363	2089505	0,9703	0,8141	9,34	2111868
58F9G10	-14744	2052463	0,9635	0,8313	9,194	2067207

[0130] Четырнадцать гибридом были субклонированы и были определены последовательности VH/VL (см. таблицу 1).

Таблица 1. Последовательность VH/VL лидерных антител мыши

Название	Последовательность (CDR подчеркнуты)	SEQ ID NO:
6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKQRPGQGLEWLG</u> <u>YINPSSGYTNYNQKFK</u> <u>DKATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASL</u> <u>RSRGYFDY</u> WGQGTTTLTVSS	1
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITCK <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKTGQSPRLLIY <u>SASNRYTGVPDRFTGSGSG</u> TDFLTISNMQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYTFGGG</u> TK LEIK	2
21C3C11B3 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCCKASGYAFIN <u>YLIE</u> WIKQRPGQGLEWIG <u>MINPGSGGTNYNEKFKDKA</u> TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARN <u>WDV</u> WGQGTTTLTVSS	3
21C3C11B3 VL	DVVMTQSPLSLPVS LGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTG</u> <u>NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK</u> <u>VSNRFS</u> GVPDFS	4

	GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SOSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	
29B2C10 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKLSCKASGYSFT <u>GYTM</u> <u>HWVKQSHGENLEWIGLINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSVTVSS</u>	5
29B2C10 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCK <u>ASONVGSNV</u> <u>AWYQQKPGQSPKALIIYSASYRYS</u> GVDPDRFTGNGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYYNSPWTF</u> FGGG TKLEIK	6
34D3H1 VH	EVHLLVESGGDLVKPGGSLKLSCAAAGFTF <u>SYGM</u> <u>SWVRQTPDKRLEWVA</u> <u>TISSGGSYTYYPDSVKGRF</u> TISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR <u>QGG</u> <u>DAMDYWGQGTSVTVSS</u>	7
34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC <u>RASQSINNLHW</u> YQQKSHESPRLLIK <u>YASQIS</u> GIPSRFSGSGSGTDF LSINSVETEDFGMYFC <u>QQNSRLTF</u> GAGTKLELK	8
37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTF <u>SDYW</u> <u>MNWVRQSPEKGLEWVA</u> <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>KGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRP</u> <u>LLWFRRYYAMDYWGQGTSVTVSS</u>	9
37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITISC <u>SASQGISNYLNWY</u> QQKPDGTVKLLIY <u>YTSSLHSG</u> VPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEPADIATYYC <u>QOYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
38A10E9A11 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKQRPQGLEWIGYINPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>LRS</u> <u>RGYFDYWGRGTTLVSS</u>	11
38A10E9A11 VL	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITC <u>KASONVGTAVA</u> WYQQKPGQSPKLLIY <u>SASNRYT</u> GVDPDRFTGSGSG TDFTLTISNMQSEDLAGYFC <u>QOYSSYPYT</u> FGGGTK LEIK	12

40A5B2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>RNIM</u> <u>HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNAGSKYNEKFKG</u> KATLTSDISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARE <u>EEV</u> <u>YYRYGAWFAY</u> WGHGTLTVSA	13
40A5B2 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS <u>CRASQSVSTSSYSY</u> <u>MHWYQQKPGQPPLIKYASNLESGVPARFSGSG</u> SGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC <u>QHSWEIPRTFGGG</u> TKLEIK	14
58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFT <u>GYIYH</u> WVKQSHGKSLEWIGY <u>ISCYNGATSFNQKFKGKA</u> TFTVDTSSSTAYMQFNLSLSEDSAVYYCART <u>ELR</u> <u>GPWFAY</u> WGQGLTVSA	15
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMASAPGEKVTMTC <u>SASSVSVMNW</u> YQQKSGTSPKRWIY <u>DTSKLAGVPARFSGSGSGTS</u> YSLTISSMEAEDAATYYC <u>QOWSNPLTFGAGTKL</u> ELK	16
2D3C12 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCCKASGYAFIN <u>YLIE</u> WIKQRPGQGLEWIG <u>MINPGSGGTNYNEKFKDKA</u> TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARN <u>WDV</u> WGQGTTLTVSS	17
2D3C12 VL	DVVMVTQSPLSLPVSLGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTG</u> <u>NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS</u> GVDPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFC <u>SQSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	18
14C2A11C6 VH	QVHLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>MHWVKQRPGQGLEWIGYINPNSAYTNYNQKFK</u> <u>DK</u> ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARR <u>VLLLRVLDFFDY</u> WGQGTTLTVSS	19
14C2A11C6 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITIN <u>RASKSINKYLTWY</u> QEKPGKTNKLLIY <u>SGSTLQSGIPSRFSGSGSGSDF</u> LTISSLEPEDFAMYYC <u>QQHNEYPLTFGTGKLELK</u>	20
14F3H2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT <u>GYTM</u> <u>NWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGIRYNQKFKGK</u>	21

	ATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR <u>WGL</u> <u>RRAMDYWGQGTSVTVSS</u>	
14F3H2 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTVN <u>AWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS</u> GVDPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWTFGGGT</u> KLEIK	22
26E1D12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTM <u>NWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLAVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSVTVSS</u>	23
26E1D12 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNV <u>AWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS</u> GVDPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWTFGGG</u> TKLEIK	24
29A7H11H4C12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTM <u>HWVKQSHGENLEWIGLINPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSVTVSS</u>	25
29A7H11H4C12 VL	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSNVA WYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVDPDRFTGNGSG TDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QOYNSSPWTFGGGT</u> KLEIK	26
34D4A10 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFISYLIE WIKRPGQGLEWIGMINPGSGGTNYNEKFKDKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARN <u>WDV</u> WGQGTTLTVSS	27
34D4A10 VL	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASVSCRSSQSLVHSTG <u>NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNREFSGVPDRFS</u> GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SQSTHVPWTF</u> GGGTKLEIK	28

Пример 2. Связывание химерных антител с GPRC5D

[0131] Гены VH и VK мыши были получены синтетическим путем, а затем соответственно клонированы в векторы, содержащие константные домены гамма-1 и каппа человека. Очищенные химерные антитела получали из трансфицированных клеток CHO.

5 [0132]

Клетки CHO-K1, стабильно экспрессирующие GPRC5D человека, собирали из колб. По 100 мкл клеток в количестве 1×10^6 клеток/мл инкубировали с первичными химерными антителами в 3-кратных серийных разведениях, начиная с 300 нМ до 0,001 нМ, в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с помощью 200 мкл буфера FACS клетки инкубировали со вторичным антителом в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл буфера FACS, переносили в пробирку BD Falcon вместимостью 5 мл и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что химерные антитела могут связываться с GPRC5D человека с высокой EC50 (фиг. 2).

[0133] Результаты представлены в таблице ниже.

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
58F9G10	-521,8	414579	0,3596	0,8258	2,289	415101
40A5B2	1487	440269	0,3436	0,8189	2,206	438781
38A9E10A	3016	386984	0,2453	1,037	1,759	383968
11						
37B9C4	2078	405062	0,249	1,045	1,774	402985
34D3H1	3448	507844	0,5214	1,012	3,322	504396
29B2C10	4326	430443	0,342	1,041	2,198	426116
21C3C11B	5774	403938	0,2293	1,286	1,696	398164
3						
6G10D9	6886	458124	0,1012	1,343	1,262	451238

15 **Пример 3. EC50 интернализации для химерных антител к GPRC5D на клетках CHO-GPRC5D**

[0134] Красители rHAb представляют собой чувствительные к pH красители, которые характеризуются очень низкой флуоресценцией при $pH > 7$ и резким увеличением флуоресценции, когда pH раствора становится кислым. Красители rHAb характеризуются максимумом возбуждения (Ex) при 532 нм и максимумом излучения (Em) при 560 нм. Антитела, конъюгированные с красителем rHAb, можно использовать для мониторинга

20

интернализации антител, опосредованной рецептором. Когда конъюгат антитело-краситель рНАb связывается со своим рецептором на клеточной мембране, он проявляет минимальную флуоресценцию. Однако при интернализации, опосредованной рецептором, конъюгаты антитело-краситель рНАb перемещаются к эндосомальным и лизосомальным везикулам, где рН является кислым, вызывая флуоресценцию красителя рНАb. Эта флуоресценция может быть обнаружена с использованием различных методик, включая визуализацию клеток, проточную цитометрию и флуоресцентные ридеры на основе планшетов с соответствующими фильтрами.

5
10 [0135] Стабильно трансфицированные клетки GPRC5D CHO человека собирали с помощью 0,05% трипсина/ЭДТА (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific, № 165305) при плотности 10000 на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20–24 ч перед обработкой антителами, мечеными с помощью рНАb.

15 [0136] Для интернализации к клеткам в разных количествах добавляли химерные антитела GPRC5D, конъюгированные с рНАb, и осторожно перемешивали в течение 1–2 мин на перемешивающем устройстве для планшетов, а затем инкубировали в течение ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinite M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

20 [0137] Результаты, нормализованные с помощью DAR, показаны на **фиг. 3**. Как показано на **фиг. 3**, протестированные химерные антитела характеризуются сильной активностью интернализации.

Пример 4. Тестирование антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)

25 [0138] В ADCC Reporter Bioassay используется альтернативное считывание на более ранней стадии активации пути ADCC MOA: активация транскрипции гена посредством пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) в эффекторной клетке. Кроме того, в ADCC Reporter Bioassay используются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных клеток. Биологическую активность антител в ADCC MOA количественно определяют с помощью люциферазы, продуцируемой в результате активации пути NFAT; активность люциферазы в эффекторной клетке количественно оценивают с помощью считывания люминесценции. Сигнал высокий, а фоновый уровень анализа низкий.

[0139] Серийные разведения химерного моноклонального антитела к GPRC5D инкубировали в течение 6 часов после индукции при 37°C со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками ADCC Bioassay) с клетками-мишенями ADCC Bioassay (GPRC5D) или без них. Активность люциферазы определяли количественно с использованием реагента Bio-Glo™ (на **фиг. 4**). Все протестированные антитела проявляли мощную способность индуцировать ADCC.

Пример 5. Гуманизация mAb мыши

[0140] Гены варибельной области антител мыши использовали для создания гуманизированных mAb. На первой стадии этого способа аминокислотные последовательности VH и VL mAb сравнивали с последовательностями в доступной базе данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти последовательности генов Ig зародышевой линии человека с в целом наилучшим совпадением.

[0141] Аминокислотные последовательности гуманизированного антитела представлены ниже.

15 Гуманизированные последовательности

А. 34D3H1

Таблица 2А. Гуманизация 34D3H1 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
34D3H1 VH	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGM <u>SWVRQTPDKRLEWVA</u> TISSGGSYTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYCARQGG <u>DAMDYWGQGTSVTVSS</u>	7
V1 (пересадка CDR)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS WVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGG <u>DAMDYWGQGTLLVTVSS</u>	35
V2 (с обратным и мутациям и)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS WVRQTPGKGLEWVA <u>T</u> ISSGGSYTYYPDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQM <u>S</u> SLRAEDTAVYYCARQGGDA MDYWGQGTLLVTVSS	36

V3 (с обратным и мутациями)	EV <u>H</u> L VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS WVRQ <u>T</u> PGK <u>R</u> LEWV <u>A</u> TISSGGSYTYYPDSVKGRFT ISRDNAKNSL <u>N</u> LQM <u>S</u> SLRAEDTAVYYCARQGGDA MDYWGQGTLLTVSS	37
-----------------------------	--	----

Таблица 2В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGMS	29
CDR-H2	TISSGGSYTYYPDSVKG	30
CDR-H3	QGGDAMDY	31

Таблица 2С. Гуманизация 34D3H1 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL 34D3H1	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC <u>RASQSINNNLHW</u> YQQKSHESPRLLIK <u>YASQIS</u> IGIPSRFSGSGSGTDF LSINSVETEDFGMYFC <u>QQSNSRL</u> TFGAGTKLELK	8
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQSINNNLHW</u> YQKPGKAPKLLIY <u>YASQIS</u> IGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYC <u>QQSNSRL</u> TFGGGTKVEIK	38
V2 (с обратным и мутациями)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNNLHW YQKPGKAPKLLIYYASQISG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDF TLTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTKVEIK	39
V3 (с обратным и мутациями)	DIQ <u>L</u> TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNNLHWY QKPGK <u>S</u> PKLLIYYASQISG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFTL TISS <u>V</u> QPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTK <u>L</u> EIK	40

V4 (с обратным и мутациями)	DI <u>V</u> LTQSPSSLS <u>V</u> SVGDRVT <u>L</u> TCRASQSINNNLHW YQKPGK <u>S</u> PKLLIYYASQSIG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFT LTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>F</u> CQQSNSRLTFGGGTK <u>L</u> EIK	41
-----------------------------	--	----

Таблица 2D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASQSINNNLH	32
CDR-L2	YASQSIG	33
CDR-L3	QQSNSRLT	34

Таблица 2E. Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	v3 VL	v4 VL
VH	34-XI				
v1 VH		34-H1L1	34-H1L2	34-H1L3	34-H1L4
v2 VH		34-H2L1	34-H2L2	34-H2L3	34-H2L4
v3 VH		34-H3L1	34-H3L2	34-H3L3	34-H3L4

B. 37B9C4

Таблица 3A. Гуманизация 37B9C4 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 37B9C4	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFS <u>DIYW</u> <u>MN</u> WVRQSPKGLWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>KGRFTISR</u> DDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTRP <u>LLWFRRYYAMDY</u> WGQGTSVTVSS	9
V1 (пересадка CDR)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTFS <u>DIYWM</u> <u>N</u> WVRQAPKGLWVA <u>EIRLKSNNYATHYAESV</u> <u>KGRFTISR</u> DNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PLLWFRRYYAMDY</u> WGQGLVTVSS	48
V2 (с обратным и мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTFS <u>DIYWM</u> NWVRQ <u>S</u> PKGLWVAEIRLKSNNYATHYAESVK	49

мутациям и)	GRFTISRDNAK <u>SS</u> LYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>TR</u> PL LWFRRYYAMDYWGQGLVTVSS	
V3 (с обратным и мутациям и)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWM NWVRQ <u>SP</u> GKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVK GRFTISR <u>DDSKSS</u> YLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>TR</u> PL LWFRRYYAMDYWGQGLVTVSS	50

Таблица 3В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	DYWMN	42
CDR-H2	EIRLKSNNYATHYAESVKG	43
CDR-H3	PLLWFRRYYAMDY	44

Таблица 3С. Гуманизация 37В9С4 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
37В9С4 VL	DIQMTQTSSLSASLGDRITISCS <u>SASQGISNYLN</u> WY QQKPDGTVKLLIY <u>YTSSLHSG</u> VPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEPADATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGSGTKLEIK	10
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCS <u>SASQGISNYLN</u> W YQQKPGKAPKLLIY <u>YTSSLHSG</u> VPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGQGTKLEI K	51
V2 (с обратным и мутациям и)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQGISNYLNW YQQKPGK <u>TV</u> KLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFGQGTKLEI K	52
V3 (с обратным и	DIQMTQSPSSLSASVGDR <u>I</u> TITCSASQGISNYLNWY QQKPGK <u>TV</u> KLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFG <u>S</u> GTKLEIK	53

мутациям и)		
----------------	--	--

Таблица 3D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASQGISNYLN	45
CDR-L2	YTSSLHS	46
CDR-L3	QQYSKLPFT	47

Таблица 3E. Гуманизированные антитела

	VL	v1 VL	v2 VL	v3 VL
VH	37B9C4-XI			
v1 VH		37-H1L1	37-H1L2	37-H1L3
v2 VH		37-H2L1	37-H2L2	37-H2L3
v3 VH		37-H3L1	37-H3L2	37-H3L3

C. 58F9G10**Таблица 4A. Гуманизация 58F9G10 – VH**

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 58F9G10	EVQLQQSGPELVKLTGASVKISCKASGYSFT <u>GYYIH</u> WVKQSHGKSLEWIGY <u>ISCYNGATSFNQKFKGKA</u> TFTVDTSSSTAYMQFNLSLSEDSAVYYCART <u>ELR</u> <u>GPWFAYWGQGLVTVSA</u>	15
V1 (пересадка CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYSFTGYYI</u> <u>HWVRQAPGQGLEWMGYISSYNAATSFNQKFKG</u> RVTMTRDTSTSTVY <u>MELSSLRSEDTAVYYCARTE</u> <u>LRGPWFAYWGQGLVTVSS</u>	61
V2 (с обратным и мутациям и)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYSFTGYYI</u> HWVRQAPGQGLEW <u>IGYISSYNA</u> ATSFNQKFKGRV <u>TFTVDTSTSTVY</u> MELSSLRSEDTAVYYCART <u>ELRG</u> PWFAYWGQGLVTVSS	62

V3 (с обратным и мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV S CKASGYSFTGYI HWV K QAPGQGLEW I GYISS Y N AATSFNQKFKGRV T F T V D T S T S T V Y M E F S S L R S E D T A V Y Y C A R T E L R G PWFAYWGQGLVTVSS	63
V4 (с обратным и мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVK I SCKASGYSFTGYI H WV K QAPGQGLEW I GYISS Y N AATSFNQKFKGR A T F T V D T S T S T A Y M E F S S L R S E D S A V Y Y C A R T E L R G P WFAYWGQGLVTVSS	64

Таблица 4В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	GYI H	54
CDR-H2	YISCYNGATSFNQKFKG	60
	YISS Y N AATSFNQKFKG	55
CDR-H3	TEL R GPWFAY	56

Таблица 4С. Гуманизация 58F9G10 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMSASPGEKVTMT C S A S S V S Y M N W YQKSGTSPKRWI Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S YSLTISSMEAEDAATYY C Q Q W S N N P L T F G A G T K L ELK	16
V1 (пересадка CDR)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT C S A S S V S Y M N W Y QQKPGKAPKLLI Y D T S K L A S G V P S R F S G S G S G T D F TLTISSLQPEDFATYY C Q Q W S N N P L T F G Q G T K L E I K	65
V2 (с обратным и мутациями)	D T Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S S V S Y M N W Y QQKPGKAPK R LIY D T S K L A S G V P S R F S G S G S G T D Y TLTISSLQPEDFATYY C Q Q W S N N P L T F G Q G T K L E I K	66

мутациям и)		
V3 (с обратным и мутациям и)	<u>D</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> QSPSSLSASVGDRVT <u>M</u> TCSASSSVSYMNW YQKPGKAPK <u>R</u> LIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISS <u>M</u> QPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKLE IK	67

Таблица 4D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	SASSSVSYMN	57
CDR-L2	DTSKSLAS	58
CDR-L3	QQWSNNPLT	59

Таблица 3E. Гуманизированные антигены

	VL	v1 VL	v2 VL	V3 VL
VH	58F9G10-XI			
v1 VH		58-H1L1	58-H1L2	58-H1L3
v2 VH		58-H2L1	58-H2L2	58-H2L3
v3 VH		58-H3L1	58-H3L2	58-H3L3
v4 VH		58-H4L1	58-H4L2	58-H4L3

D. 6G10D9**Таблица 5A. Гуманизация 6G10D9 – VH**

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH 6G10D9	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYT</u> <u>M</u> HWVKQRPGQGLEWLG <u>Y</u> INPSSGYTNYN <u>Q</u> KFK <u>D</u> KATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>L</u> <u>R</u> SRGYFDYWGQGTTLTVSS	1
V1 (пересадка CDR)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT <u>TYT</u> <u>M</u> HWVRQAPGQGLEWMG <u>Y</u> INPSSGYTNYN <u>Q</u> KFK	74

	<u>DRV</u> TMTRDTSTSTVYMELSSLRSED <u>AVYYCSRL</u> <u>RSRGYFDY</u> WGQGLVTVSS	
V2 (с обратным и мутациями)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>S</u> CKASGYTFTTYTM HWVRQAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKDR VTMT <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED <u>AVYYC</u> <u>A</u> RLRS RGYFDYWGQGLVTVSS	75
V3 (с обратным и мутациями)	QVQLVQSGAEV <u>A</u> KPGASVKV <u>S</u> CKASGYTFTTYTM HWV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKDR VTMT <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED <u>AVYYC</u> <u>A</u> SLRSR GYFDYWGQGLVTVSS	76
V4 (с обратным и мутациями)	QVQLVQSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> QAPGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD RVT <u>L</u> <u>A</u> DTSTSTVYMELSSLRSED <u>AVYYC</u> <u>A</u> SLRS RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	77
V5 (с обратным и мутациями)	QVQL <u>Q</u> QSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> <u>Q</u> <u>R</u> PGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD RVT <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> STSTVYMELSSLRSED <u>AVYYC</u> <u>A</u> SLRS RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	78
V6 (с обратным и мутациями)	QVQL <u>Q</u> QSGAEV <u>A</u> KPGASVK <u>M</u> SCKASGYTFTTYT MHWV <u>K</u> <u>Q</u> <u>R</u> PGQGLEW <u>L</u> GYINPSSGYTNYNQKFKD <u>R</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>K</u> STSTVYMELSSLRSED <u>AVYYC</u> <u>A</u> SLRS RGYFDYWGQGL <u>L</u> TVSS	79

Таблица 5В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	TYTMH	D01
CDR-H2	YINPSSGYTNYNQKFKD	D02

CDR-H3	LRSRGYFDY	D03
--------	-----------	-----

Таблица 5С. Гуманизация 6G10D9 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKTGQSPRLLIY <u>SASNRYT</u> GVDPDRFTGSGSG TDFTLTISNMQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYTFGGG</u> TK LEIK	2
V1 (пересадка CDR)	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KASQNVGTAVVW</u> YQQKPGKAPKLLIY <u>SASNRYT</u> GVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSSYPYTFGQG</u> TKLEI K	80
V2 (с обратным и мутациям и)	DIQLTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTITCKASQNVGTAVVW YQQKPGK <u>S</u> PKLLIYASASNRYTGVPSRFSGSGSGTEF TLTISSLQPEDFAT <u>F</u> YCCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK	81
V3 (с обратным и мутациям и)	DIQ <u>M</u> TQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTITCKASQNVGTAVV WYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYASASNRYTGVPSRFSGSGSGT EFTLTIS <u>S</u> MQPEDFAT <u>F</u> FCQQYSSYPYTFGQGTKLE IK	82
V4 (с обратным и мутациям и)	DI <u>V</u> MTQSPSFLS <u>T</u> SVGDRVTITCKASQNVGTAVV WYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYASASNRYTGV <u>P</u> DRFSGSGSGT EFTLTIS <u>S</u> MQPEDFAT <u>F</u> FCQQYSSYPYTFG <u>G</u> GTKLE IK	83
V1a (версия а пересадки CDR)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS <u>C</u> <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASNRYT</u> GIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QQYSSYPYTFGQG</u> TKL EIK	84

Пример 6. Тестирование гуманизированных антител

[0142] В этом примере тестировали некоторые гуманизированные антитела в отношении способности связываться с GPRC5D, экспрессируемым на клетках CHO-K1.

[0143] Из протестированных гуманизированных антител, антитела, происходящих из 6G10D9, 6-H2L1 и 6-H3L3, превзошли другие (фиг. 5, таблица 6).

Таблица 6. Показатели активности гуманизированных антител из 6G10D9 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6G10D9-XI	6858	121725	0,2992	1,525	1,991	114867
6-H1L1	192,6	~ 6397	~ 3,102	1,198	~ 1264	~ 6205
6-H1L2	191,9	898894	5,224	1,19	167639	898702
6-H1L3	226,2	16478302	5,389	1,156	244790	16478076
6-H2L1	189,1	661560	5,039	1,232	109294	661371
6-H2L2	192,5	1271084	5,37	1,191	234364	1270892
6-H2L3	215,7	10592380	5,039	1,23	109279	10592164
6-H3L1	-205,1	74293	2,352	0,8392	225,1	74498
6-H3L2	68,94	47463	2,244	0,9532	175,3	47394
6-H3L3	3994	119304	0,9553	1,13	9,022	115310
6-H4L1	61,5	50293	1,654	0,9277	45,05	50231
6-H4L2	9,56	39449	1,976	0,911	94,63	39440
6-H4L3	2344	126413	0,9049	1,052	8,033	124069

[0144] Как показано на фиг. 6 и в таблице 7, оказалось, что все гуманизированные версии 58F9G10 обладают хорошими характеристиками.

10 **Таблица 7. Показатели активности гуманизированных антител из 58F9G10 в отношении связывания GPRC5D**

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
58F9G10-XI	6697	127349	0,2925	1,292	1,961	120652
58-H1L1	15047	107881	0,2519	1,342	1,786	92834
58-H1L2	5500	114432	0,2632	1,238	1,833	108932
58-H1L3	4227	105346	0,2308	1,14	1,701	101119
58-H2L1	3617	109672	0,3776	1,064	2,386	106055
58-H2L2	4837	107888	0,3448	1,091	2,212	103050
58-H2L3	1229	91713	0,2697	0,9633	1,861	90483
58-H3L1	9887	103663	-0,1918	1,382	0,643	93776
58-H3L2	5981	105458	0,3742	1,195	2,367	99476
58-H3L3	4022	97718	0,3177	1,105	2,078	93695
58-H4L1	4993	104559	0,3655	1,179	2,32	99566
58-H4L2	4600	105051	0,3407	1,143	2,191	100451
58-H4L3	6249	102650	0,2874	1,27	1,938	96401

[0145] Аналогично, как показано на **фиг. 7** и в **таблице 8**, оказалось, что все гуманизированные версии 34D3H1 обладают хорошими характеристиками, сравнимыми с химерным антителом.

Таблица 8. Показатели активности гуманизированных антител из 34D3H1 в отношении связывания GPRC5D

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
34-XI	16525	192054	0,4947	1,454	3,124	175530
34-H1L1	10921	196570	0,5908	1,314	3,898	185650
34-H1L2	13856	182030	0,5836	1,436	3,834	168174
34-H1L3	10620	185840	0,5732	1,167	3,743	175220
34-H1L4	10299	188925	0,5999	1,195	3,98	178626

34- H2L1	7854	187153	0,6188	1,173	4,157	179298
34- H2L2	8736	178873	0,6254	1,118	4,221	170137
34- H2L3	7063	185842	0,5832	1,11	3,83	178779
34- H2L4	4393	192405	0,6092	1,041	4,066	188012
34- H3L1	11139	178248	0,5207	1,228	3,317	167109
34- H3L2	9036	179809	0,6464	1,146	4,43	170773
34- H3L3	9118	192976	0,6508	1,1	4,475	183858
34- H3L4	12751	192533	0,5981	1,263	3,963	179782

[0146] Также, как показано на **фиг. 8** и в **таблице 9**, оказалось, что все гуманизированные версии 37B9C4 обладают хорошими характеристиками, сравнимыми с химерным аналогом.

5 **Таблица 9. Показатели активности гуманизированных антител из 37B9C4 в отношении связывания GPRC5D**

	Минимальное значение	Максимальное значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
37B9C4-XI	11711	188479	0,2364	1,502	1,723	176769
37- H1L1	9596	178413	0,3574	1,613	2,277	168817
37- H1L2	8848	181865	0,3502	1,534	2,24	173017
37- H1L3	10445	173229	0,2332	1,528	1,711	162784
37- H2L1	9184	175072	0,351	1,583	2,244	165888

37- H2L2	9383	175293	0,3455	1,656	2,216	165910
37- H2L3	8049	168032	0,3334	1,564	2,155	159982
37- H3L1	6372	179261	0,2921	1,35	1,96	172889
37- H3L2	9193	179304	0,3153	1,428	2,067	170111
37- H3L3	7780	181053	0,2846	1,305	1,926	173273

[0147] На основании приведенных выше данных, гуманизированные антитела 6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 и 37-H1L1 были отобраны для дальнейшего подтверждающего тестирования.

Пример 7. Подтверждающее тестирование отобранных гуманизированных антител

5 [0148] В этом примере тестировали некоторые гуманизированные антитела (6-H3L3, 6-H4L3, 58-H1L1, 58-H3L1, 34-H1L1 и 37-H1L1) в отношении их способности связываться с белком GPRC5D человека, экспрессированным на клетках CHO-K1 и NCI-H929.

[0149] Данные связывания с CHO-K1 представлены на **фиг. 9** и обобщены в **таблице 10** ниже.

10 **Таблица 10. Связывание с GPRC5D на клетках CHO-K1**

	Минимально е значение	Максимально е значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6-XI	523,9	104077	0,4723	1,095	2,967	103553
58-XI	52,25	107000	0,5562	0,9481	3,599	106948
6- H3L3	172	134045	1,412	0,8045	25,82	133873
6- H4L3	109,4	145833	1,421	0,7392	26,34	145724
58- H1L1	275,4	99454	0,579	0,972	3,793	99178
58- H3L1	75,37	104402	0,612	0,9135	4,093	104326
34-XI	688,6	117714	0,5776	1,054	3,781	117025

37-XI	792,6	113379	0,3877	1,175	2,442	112586
34- H1L1	170,8	119038	0,781	0,8745	6,04	118867
37- H1L1	523,2	102496	0,511	1,042	3,244	101973

Таблица 11. Связывание с GPRC5D на клетках NCI-H929

	Минимально е значение	Максимально е значение	LogEC50	Угловой коэффициент Хилла	EC50	Интервал
6-XI	269,4	13785	0,05146	1,313	1,126	13515
58-XI	261,4	14738	0,1596	1,269	1,444	14476
6- H3L3	129,8	21859	1,465	0,8063	29,18	21730
6- H4L3	80,05	28987	1,606	0,7142	40,33	28907
58- H1L1	281	13474	0,1648	1,319	1,462	13193
58- H3L1	275,5	13934	0,3	1,297	1,995	13658
34-XI	181,1	18146	0,7587	0,9911	5,738	17965
34- H1L1	199,3	17911	0,8048	1,011	6,379	17712
37-XI	337,6	13807	-0,05621	1,41	0,8786	13470
37- H1L1	341,8	13534	-0,1991	1,419	0,6323	13192

[0150] Таким образом, эти данные подтверждают, что эти отобранные гуманизированные антитела пригодны для дальнейшей клинической разработки.

Пример 8. ADCC гуманизированных антител

- 5 **[0151]** В ADCC Reporter Bioassay используется альтернативное считывание на более ранней стадии активации пути ADCC MOA: активация транскрипции гена посредством пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток) в эффекторной клетке. Кроме того, в ADCC Reporter Bioassay используются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, вариант V158 (высокая аффинность), и элемент
- 10 ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка, в качестве эффекторных

клеток. Биологическую активность антител в ADCC MOA количественно определяют с помощью люциферазы, продуцируемой в результате активации пути NFAT; активность люциферазы в эффекторной клетке количественно оценивают с помощью считывания люминесценции. Сигнал высокий, а фоновый уровень анализа низкий.

5 [0152] Серийные разведения Ab к GPRC5D человека инкубировали в течение 6 часов после индукции при 37°C со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками ADCC Bioassay) и с клетками-мишенями ADCC Bioassay (экспрессирующими GPRC5D). Активность люциферазы определяли количественно с использованием реагента Bio-GloTM.

10 [0153] Результаты представлены на **фиг. 11**, на которой показано, что эти гуманизированные антитела индуцировали сильную ADCC-активность в линиях клеток со сверхэкспрессией GPRC5D и линиях клеток MM (множественной миеломы) с эндогенной экспрессией.

Пример 9. Интернализация гуманизированных антител

15 [0154] В этом примере тестировали гуманизированные антитела в отношении их показателей активности индукции интернализации. В примере использовали новый гидрофильный и яркий чувствительный к pH краситель (краситель pHAb), который не флуоресцирует при нейтральном pH, но становится высоко флуоресцентным при кислом pH при интернализации. Его можно использовать для обнаружения процесса
20 интернализации. Клетки NCI-H929 и MM.1R эндогенно экспрессировали GPRC5D человека в качестве клеток-мишеней, для оценки интернализации антитела к GPRC5D человека *in vitro* добавляли детектирующее антитело, меченное красителем pHAb.

[0155] Серийные разведения антител к GPRC5D человека инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Обнаружена активность люциферазы. Результаты на **фиг. 12**,
25 показывают, что эти гуманизированные антитела обладают очень сильной активностью интернализации как в отношении линий клеток со сверхэкспрессией GPRC5D, так и в отношении линий клеток MM с эндогенной экспрессией.

Пример 10. Показатель активности уничтожения для ADC на основе GPRC5D

[0156] В этом примере тестировали два конъюгата антитело-лекарственное средство
30 (ADC) в отношении их показателей активности уничтожения клеток-мишеней. Эти ADC предусматривали 37B9C4 и 58F9G10, соответственно конъюгированные с токсичным лекарственным средством монометилауристатином E (MMAE).

[0157] Сконструированные клетки HEK293 и NCI-H929, экспрессирующие GPRC5D человека (HEK293/H_GPRC5D и NCI-H929/H_GPRC5D), клетки NCI-H929 и MM.1R,
35 эндогенно экспрессирующие GPRC5D, высевали в 96-луночный планшет по 3000~4000

клеток на лунку. Клетки обрабатывали с помощью 37B9C4-MMAE и 58F9G10-MMAE в соответствующих концентрациях в течение 5 дней. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTite, посеянного в 96-луночный планшет при 3000~4000 клеток на лунку с реагентом r-Glo. Активность люциферазы обнаруживали с помощью Envision. Результаты на **фиг. 13** и в **таблице 12**, показывают, что эти гуманизированные антитела обладают очень сильной активностью уничтожения.

Таблица 12. Показатели активности уничтожения для ADC

	HeK-293/H_GPRC5D (IC50, нМ)	MM.1R (IC50, нМ)	NCI-H929 (IC50, нМ)	NCI-H929/GPRC5D (IC50, нМ)
37B9C4-MMAE	0,025	0,14	0,23	0,11
58F9G10-MMAE	0,026	0,07	0,99	0,14

Пример 11. Показатели противоопухолевой активности in vivo

[0158] В этом примере для тестирования показателей противоопухолевой активности антитела 37B9C4 (H1L1) использовали модель CDX на животных.

[0159] В этом исследовании использовали 6-8-недельных самок мышей NCG (Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd). Каждую мышь инокулировали подкожно в правую подмышечную (боковую) область опухолевые клетки MM.1R (2×10^6) в 0,1 мл PBS с матригелем (V:V=1:1) для развития опухоли. Животных случайным образом группировали, когда объем опухоли достигал примерно 60 мм^3 , после чего начинали лечение для исследования эффективности. 37B9C4 в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг вводили внутривенно (в/в) в день 0, день 7, день 14. Эксперимент прекращали в день 19, когда средний объем опухоли в группе среды-носителя превышал 2000 мм^3 . Средний объем опухоли в группе PBS, группе 37B9C4 (1 мг/кг), группе 37B9C4 (3 мг/кг) и группе 37B9C4 (10 мг/кг) составлял $2498,58 \text{ мм}^3$, $1196,15 \text{ мм}^3$, $0,00 \text{ мм}^3$ (6/6 CR) и $0,00 \text{ мм}^3$ (6/6 CR) соответственно. Размер опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем выражали в мм^3 по формуле: $V = 0,5 a \times b^2$, где a и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Точки данных представляют среднее значение группы (n = 6), планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM).

[0160] Вес тела мышей, несущих опухоли MM.1R, регулярно подвергали мониторингу в качестве косвенного показателя токсичности. На **фиг. 14A** показана кривая роста опухоли у мышей, несущих опухоли MM.1R, после введения 37B9C4. Антитело

дозозависимым образом обеспечивало подавление роста опухоли в этой модели опухоли, и полное подавление опухоли достигалось при дозе 3 мг/кг или выше.

[0161] Подробные изменения веса тела и относительное изменение веса тела мышей с опухолями MM.1R после введения показаны на **фиг. 14В**. В течение периода введения все группы мышей не имели значительной потери веса тела, а мыши в группе введения характеризовались хорошей переносимостью, что свидетельствует о безопасности лечения.

* * *

[0162] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться описанными конкретными вариантами осуществления, которые предназначены в качестве одиночных иллюстраций отдельных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что в способах и композициях по настоящему изобретению могут быть сделаны различные модификации и вариации без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение охватывает модификации и варианты настоящего изобретения при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения, и их эквиваленты.

[0163] Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана в качестве включенной посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания в отношении белка, представляющего собой представителя D группы 5 семейства C рецепторов, сопряженных с G-белком человека (GPCR5D), где антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и при этом CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают:
- 10 (a) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:42-47;
(b) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:29-34;
(c) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:54-59 или
(d) аминокислотные последовательности под SEQ ID NO:68-73.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 42-47.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 9 и 48-50, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:10 и 51-53.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 48, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 51.
- 25 5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 29-34.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 35-37, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:8 и 38-41.
- 30 7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.
- 35

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 54-59.

5 9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 61-64, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 16 и 65-67.

10 10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65.

15 12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 соответственно предусматривают аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 68-73.

20 13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где VH предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1 и 74-79, и VL предусматривает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 2 и 80-86.

25 14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где VH предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и VL предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

30 16. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-15, которые являются гуманизированными.

17. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-16, которые являются ADCC-компетентными.

35 18. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-16, дополнительно содержащие цитотоксическое лекарственное средство, конъюгированное с антителом или его фрагментом.

19. Биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16 и второй антигенсвязывающий фрагмент, характеризующийся специфичностью в отношении второго белка-мишени.

20. Биспецифическое антитело по п. 19, где второй белок-мишень выбран из группы, состоящей из CD3, CD16, CD19, CD28, CD64 и 4-1BB.

21. Биспецифическое антитело по п. 19, где второй белок-мишень представляет собой CD3.

22. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-21.

23. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий (а) обработку Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) или макрофага *in vitro* антителом или его фрагментом по любому из пп. 1-21 и (b) введение обработанной клетки пациенту.

24. Способ по п. 23, дополнительно включающий перед стадией (а) выделение Т-клетки, NK-клетки или макрофага из организма индивидуума.

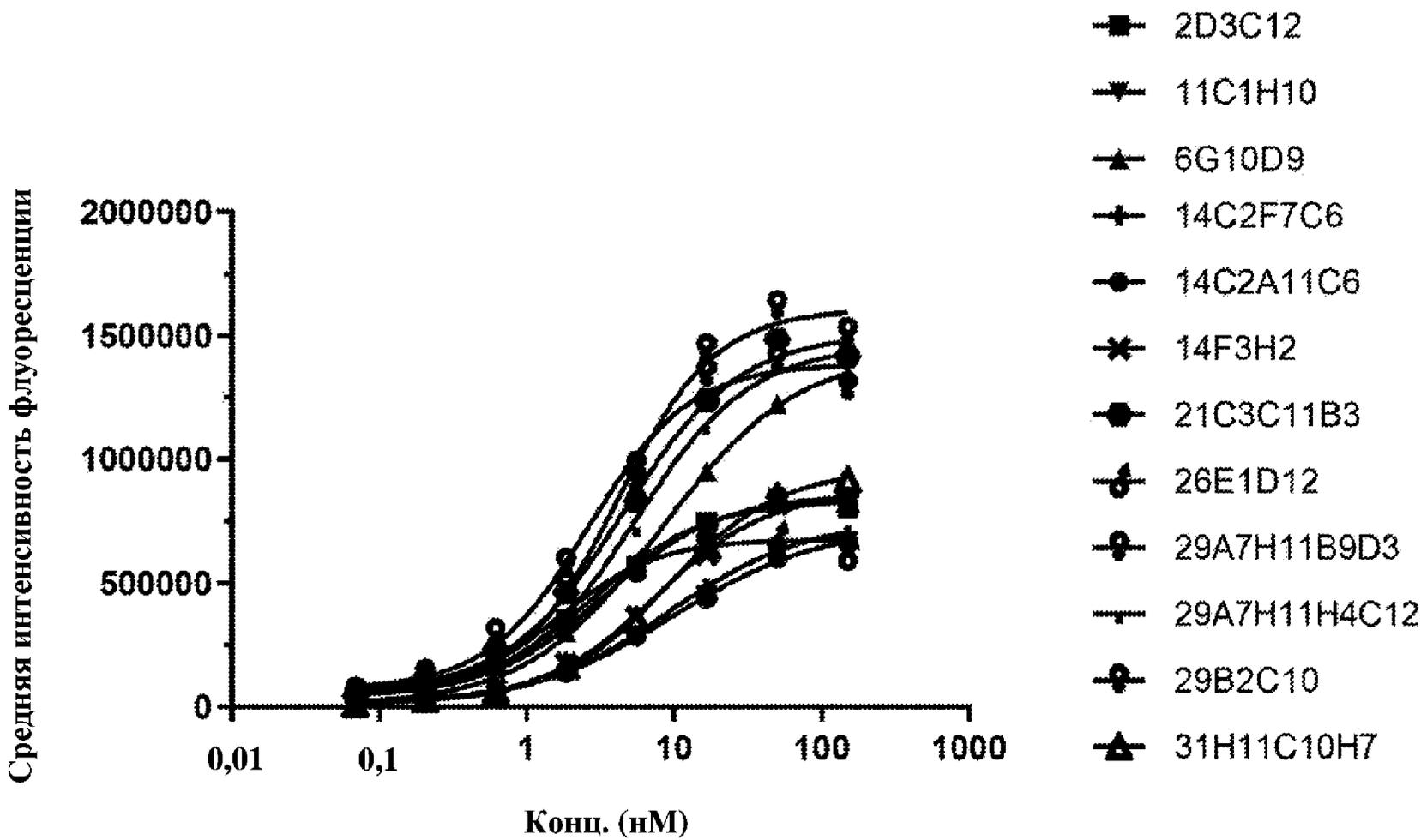
25. Способ по п. 24, где Т-клетку, NK-клетку или макрофаг выделяют из организма пациента.

26. Способ по п. 23, где Т-клетка представляет собой инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию.

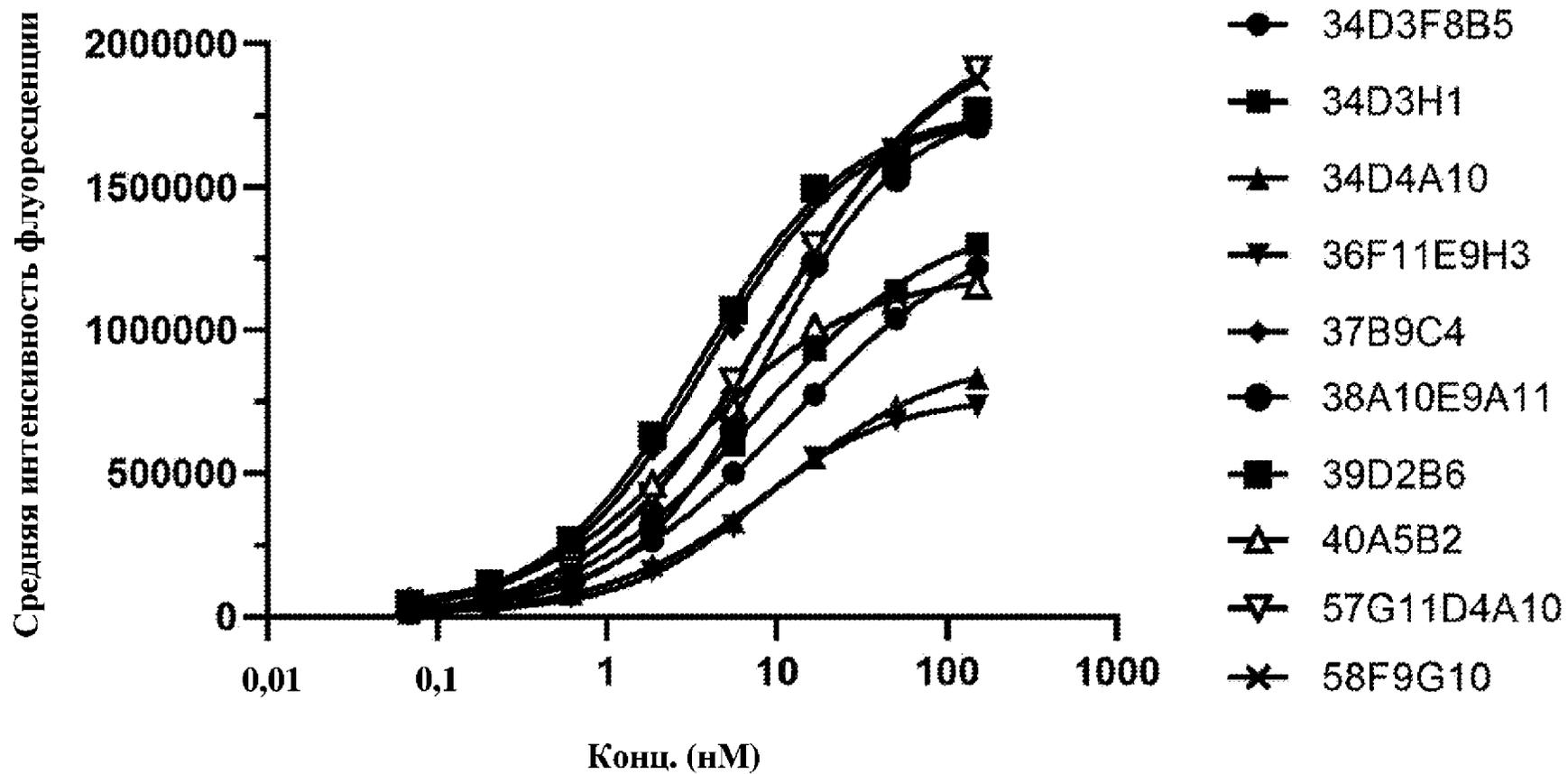
27. Способ по любому из пп. 22-26, где рак представляет собой гематологический рак.

28. Способ по п. 27, где гематологический рак представляет собой В-клеточный рак, при котором экспрессируется GPRC5D.

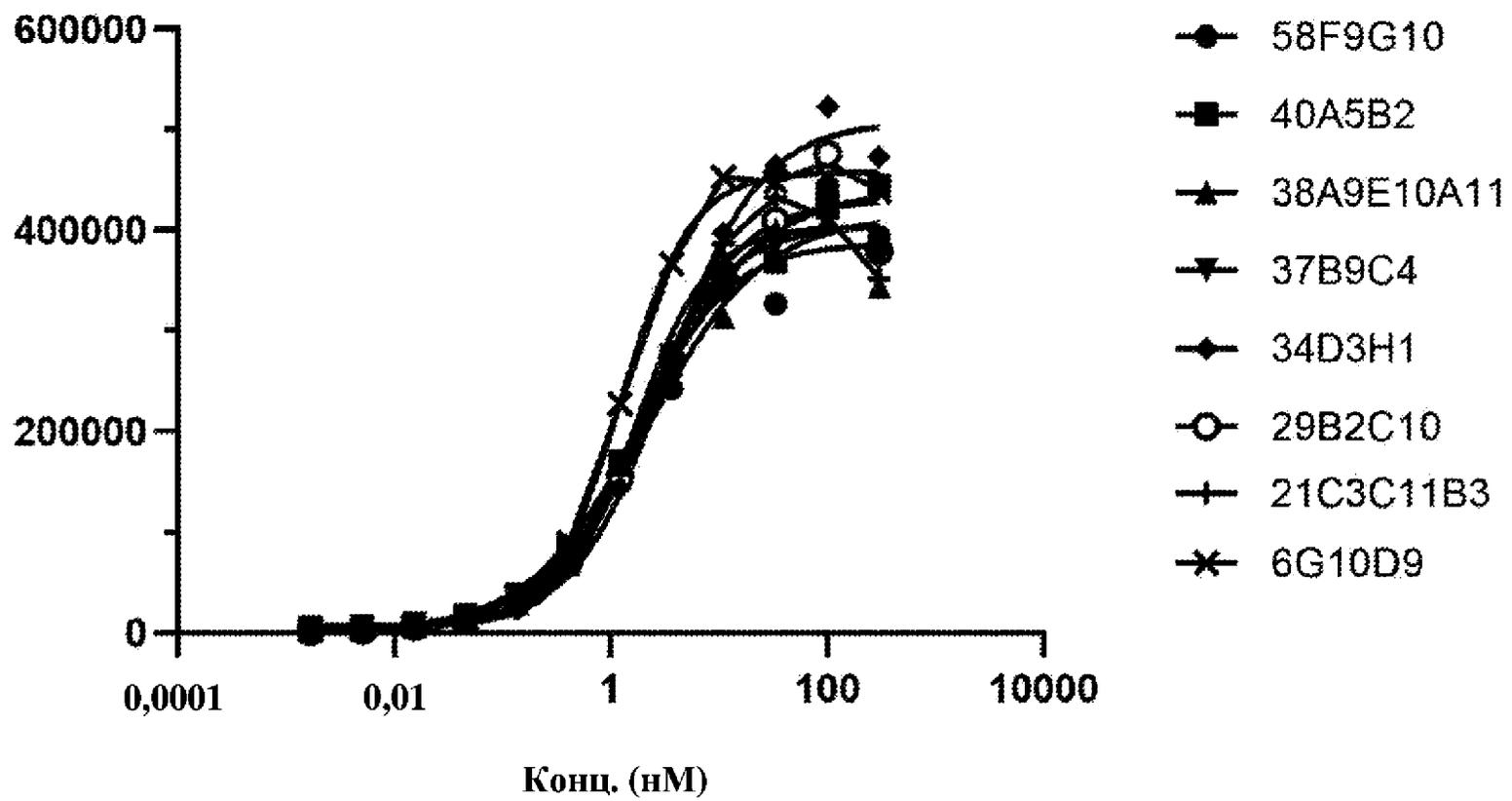
29. Способ по п. 28, где В-клеточный рак, при котором экспрессируется GPRC5D, представляет собой множественную миелому.



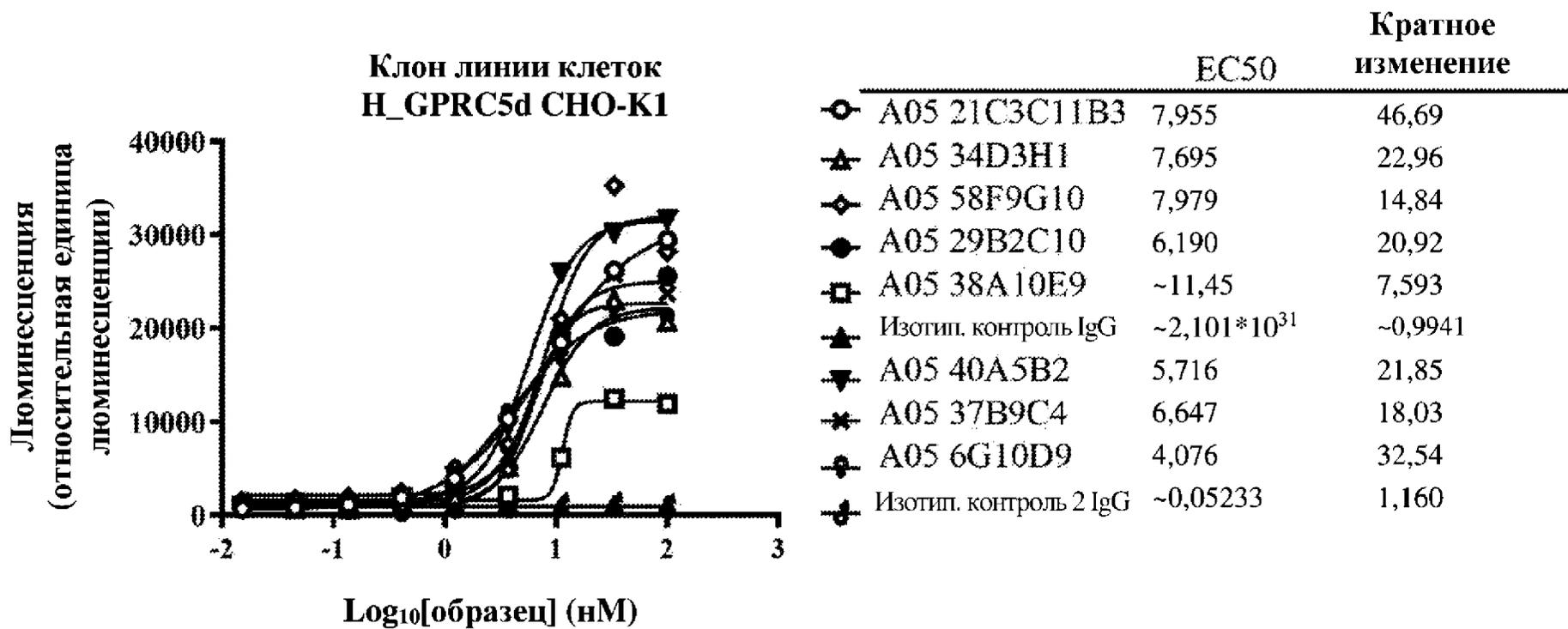
ФИГ. 1



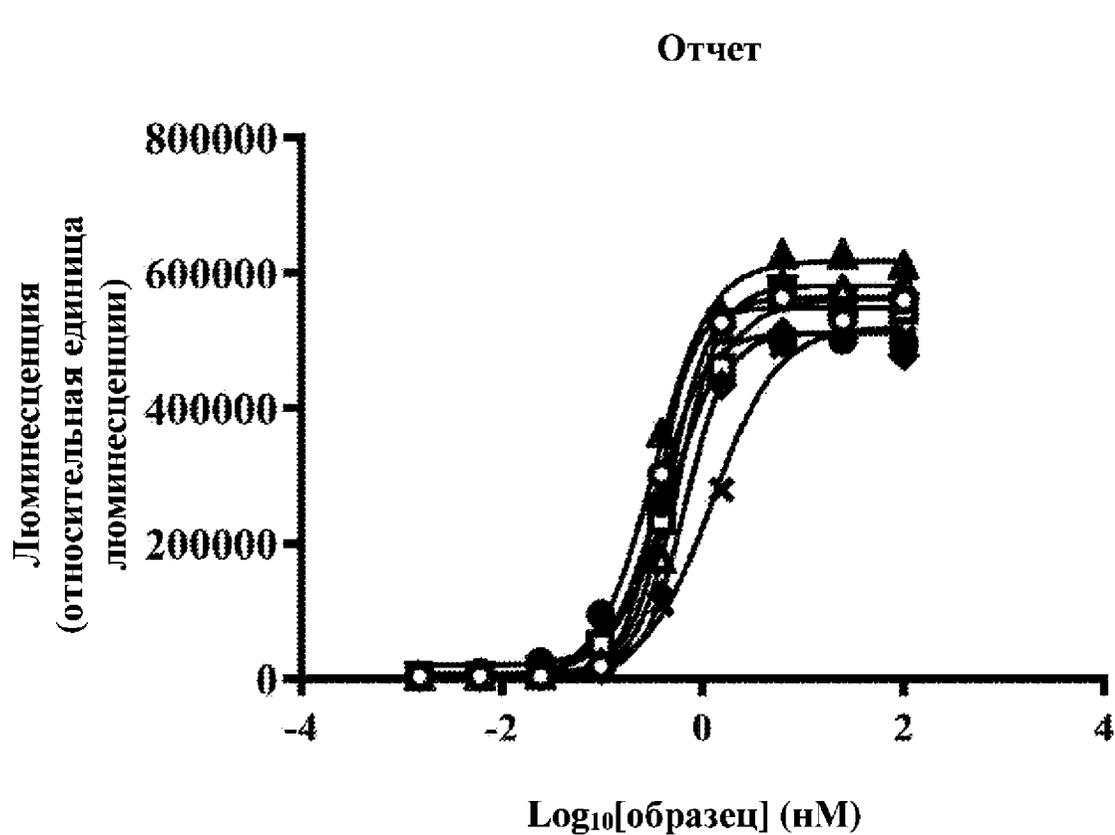
ФИГ. 1 (продолж.)



ФИГ. 2

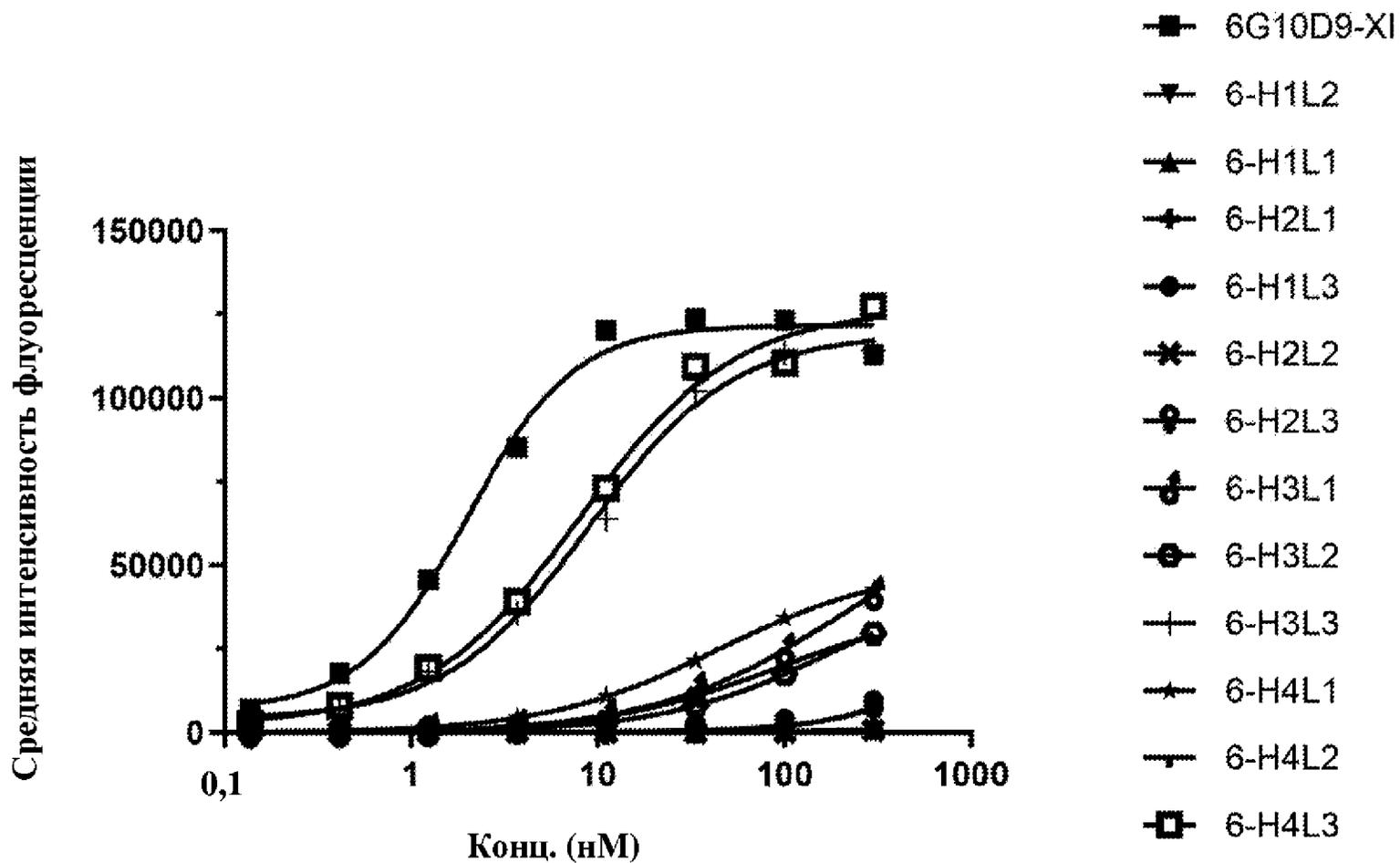


ФИГ. 3

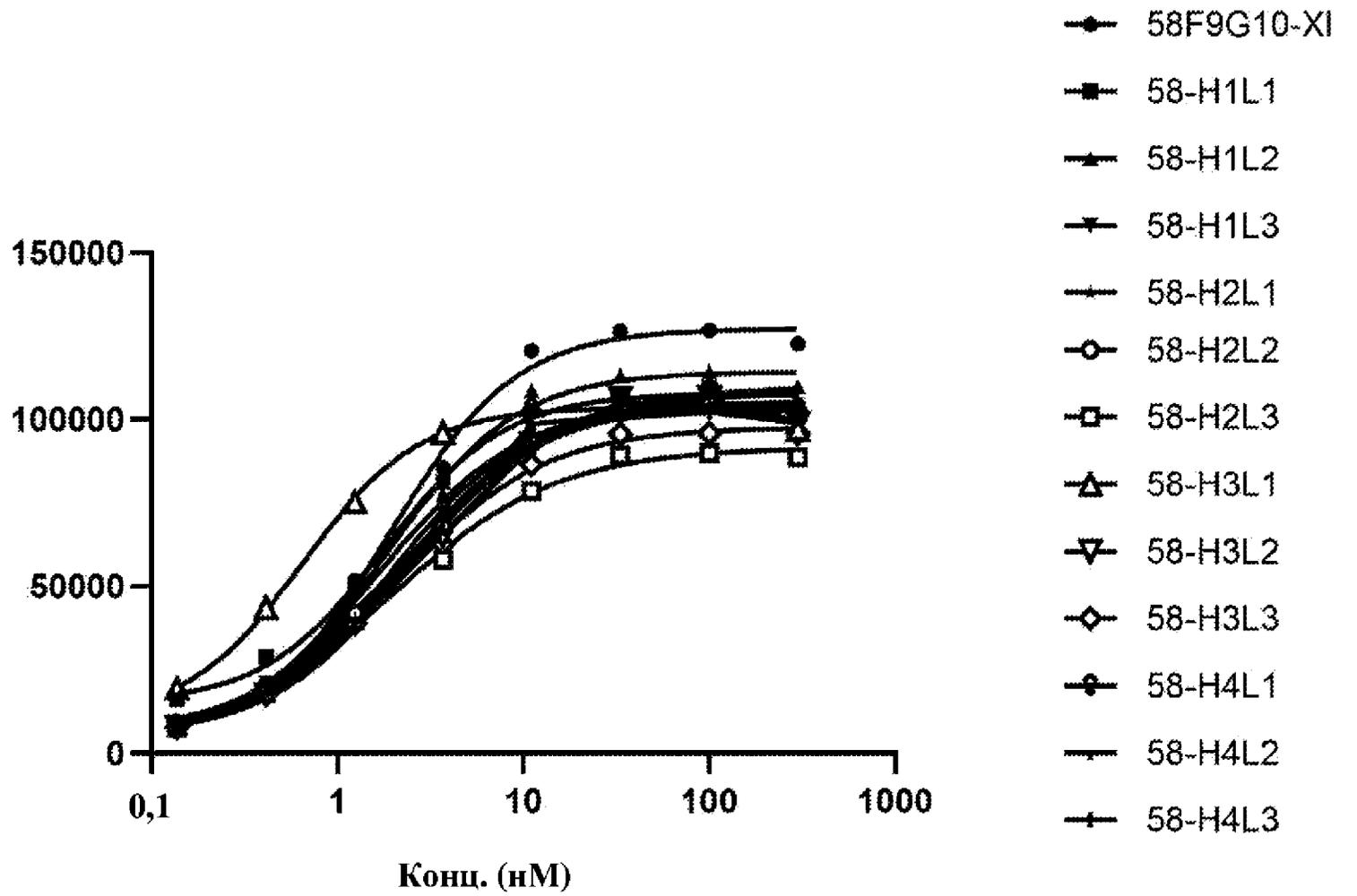


	EC50
○ 21C3C11B3	0,3625
▲ 37B9C4	0,5871
◆ 38A10E9A11	0,6834
● 6G10D9	0,3657
□ 29B2C10	0,5051
▲ 34B3H1	0,3300
▼ 40A5B2	0,4714
* 58F9G10	1,260

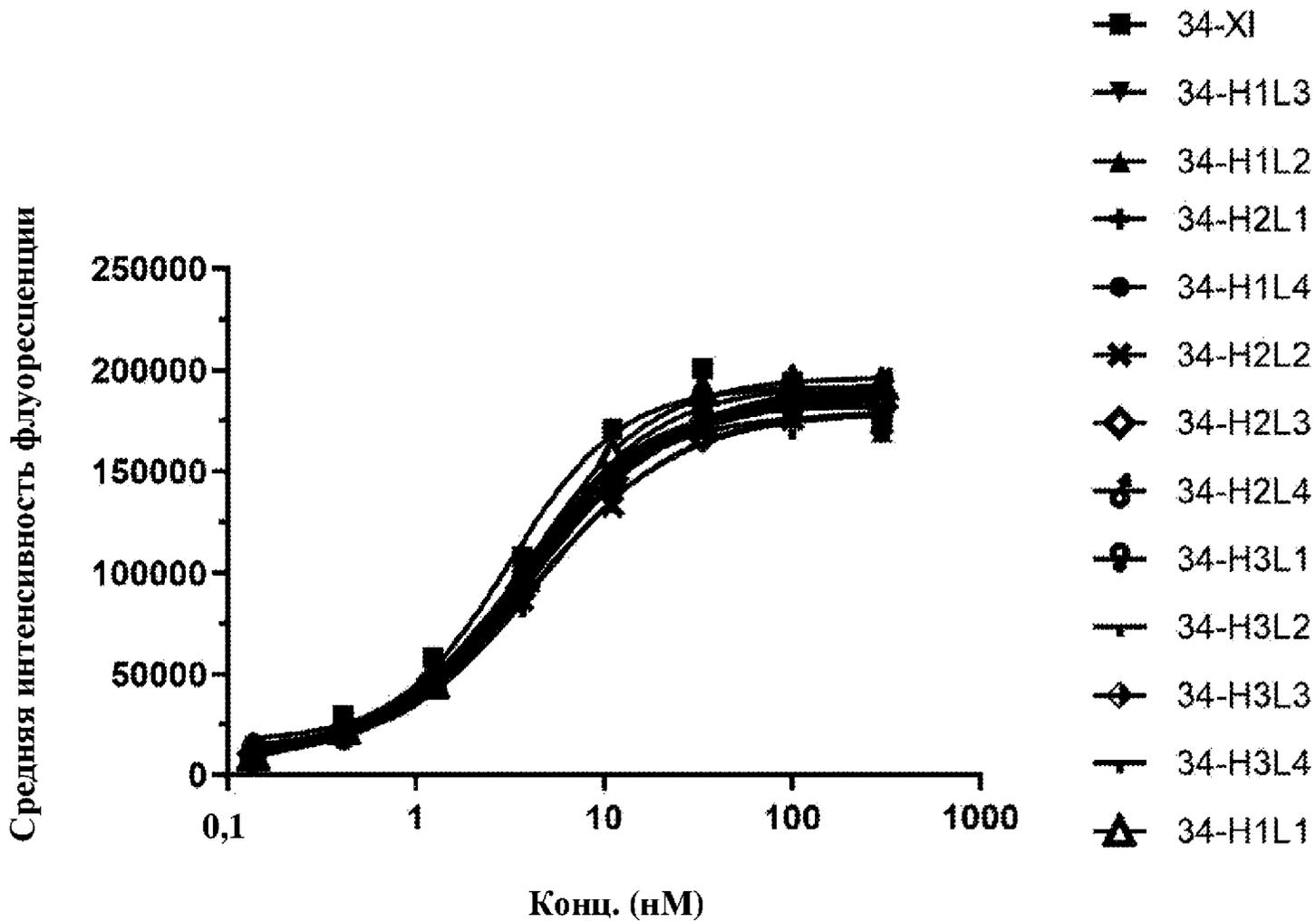
ФИГ. 4



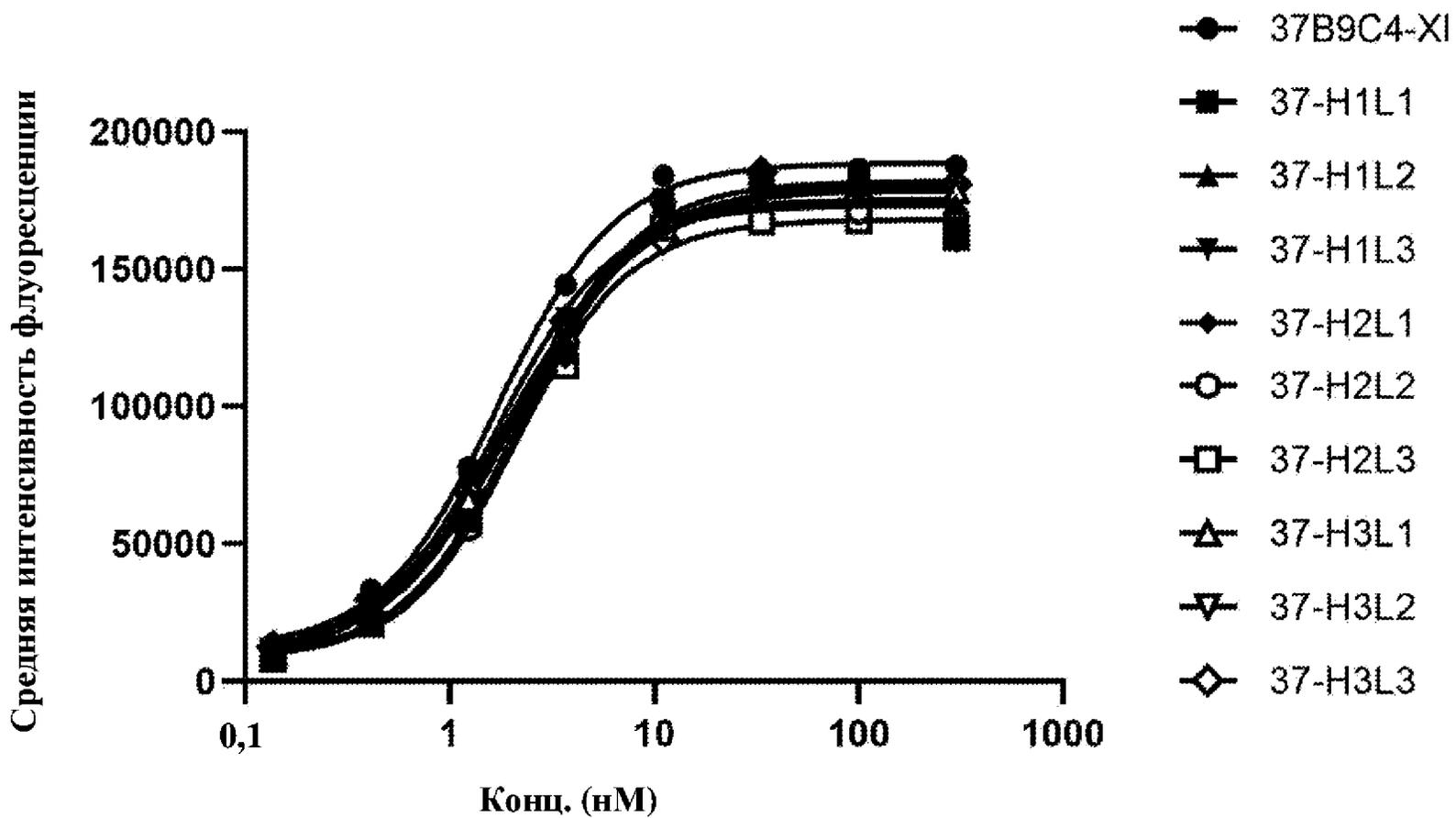
ФИГ. 5



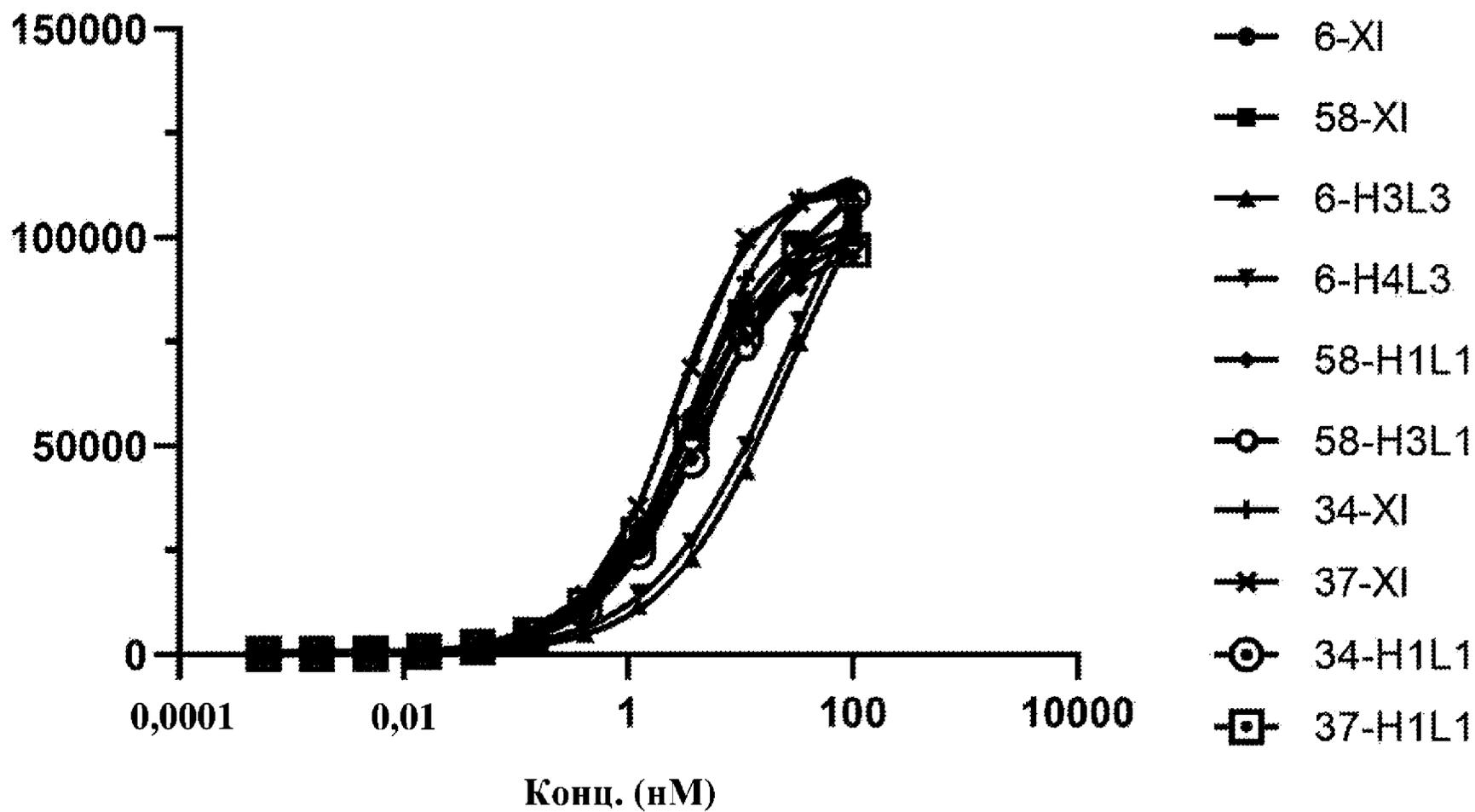
ФИГ. 6



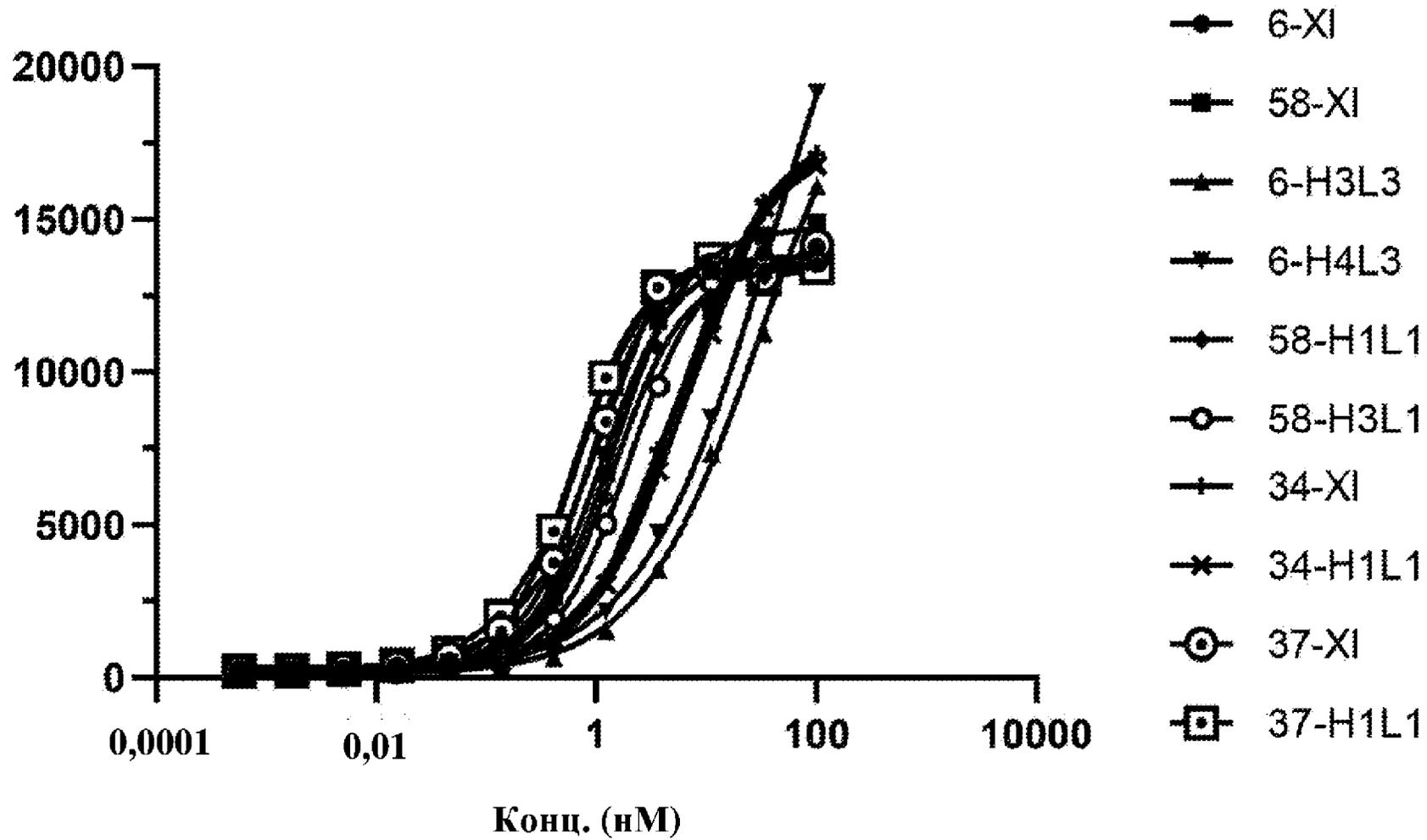
ФИГ. 7



ФИГ. 8

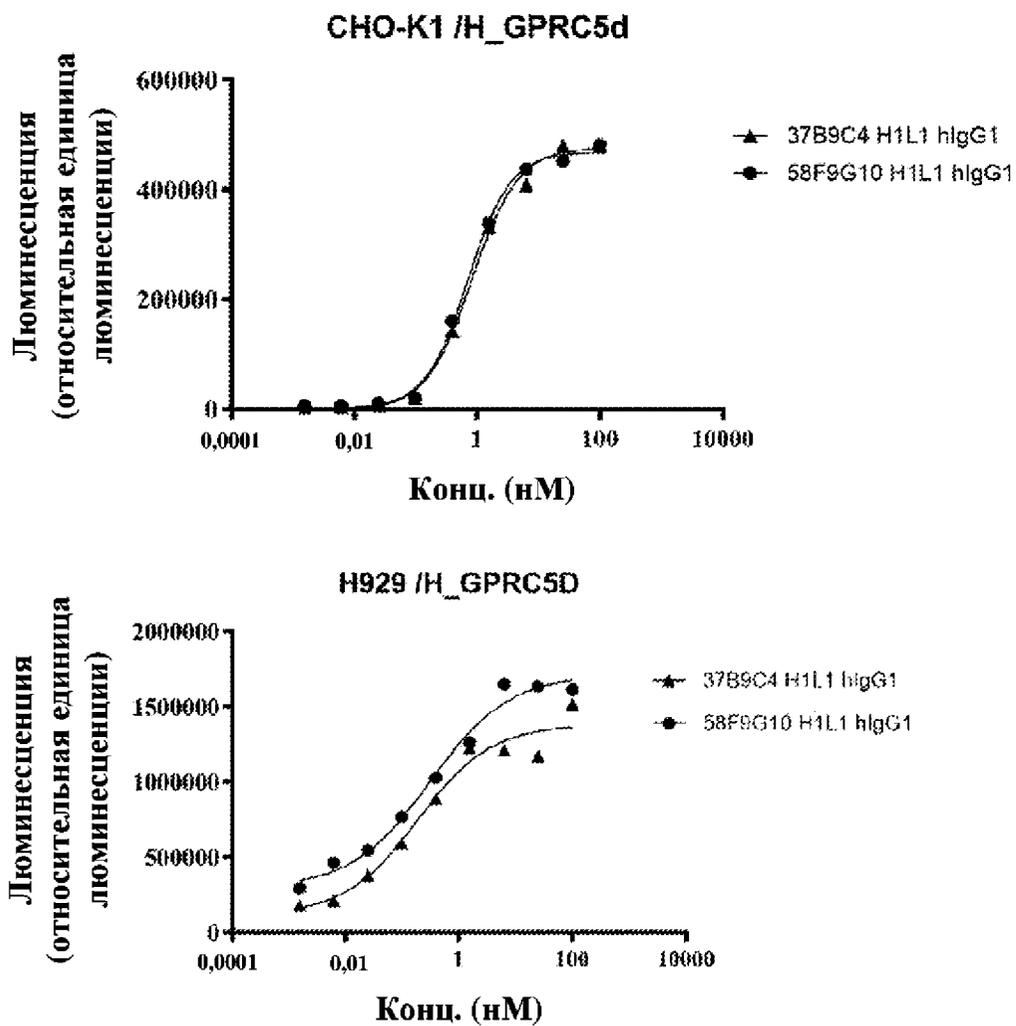


ФИГ. 9



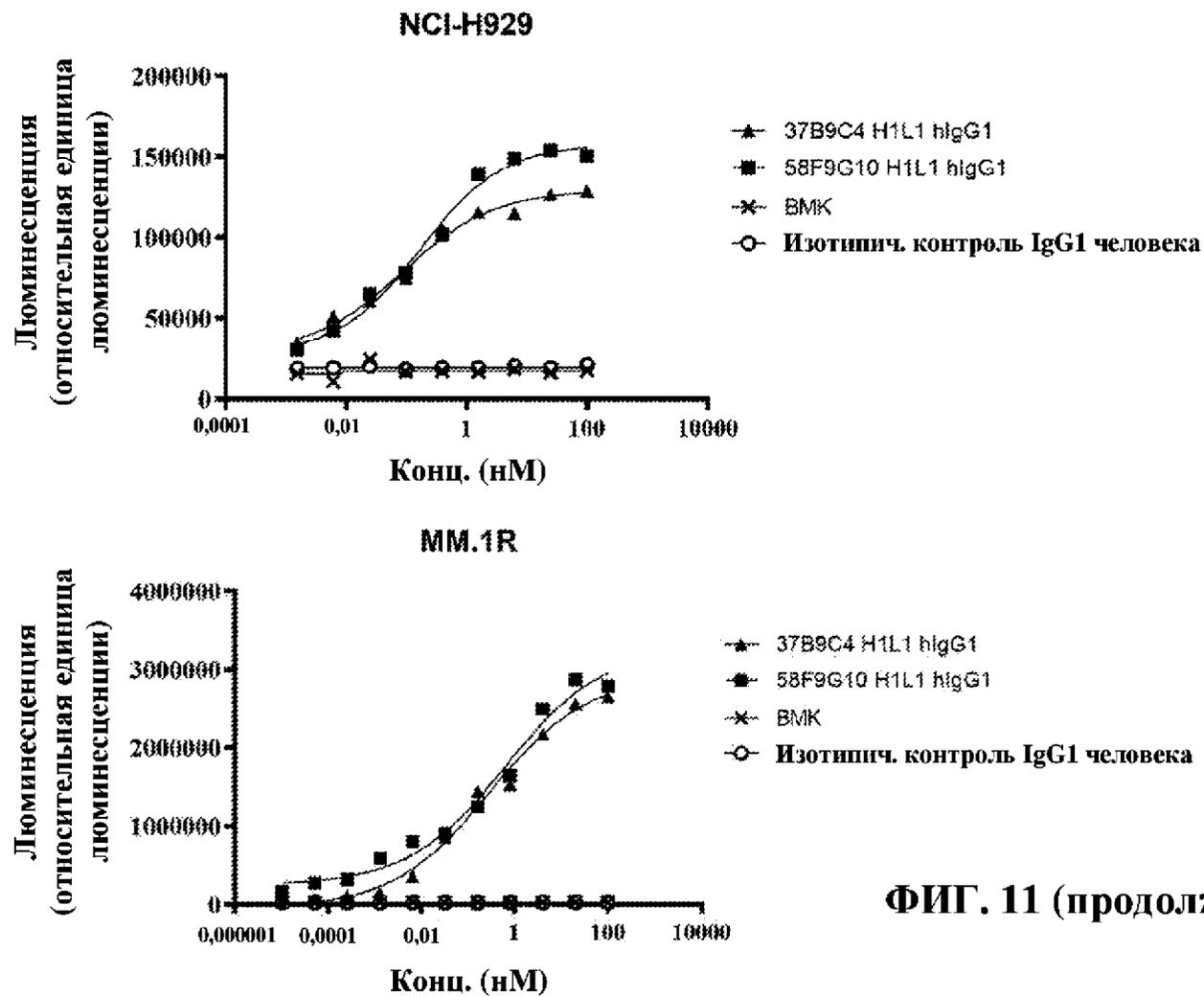
ФИГ. 10

Линии клеток со сверхэкспрессией GPRC5D



ФИГ. 11

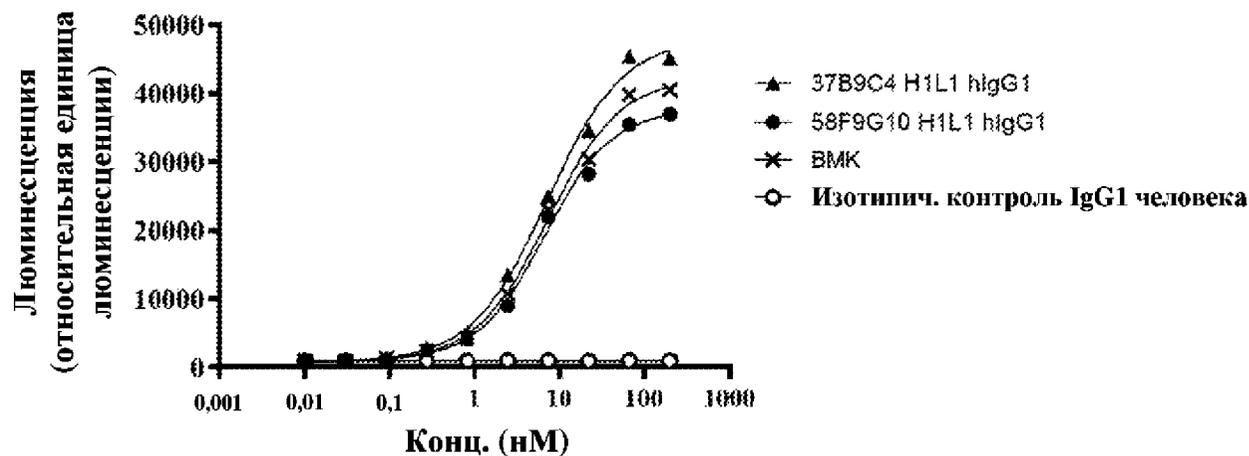
Линии клеток ММ с эндогенной экспрессией



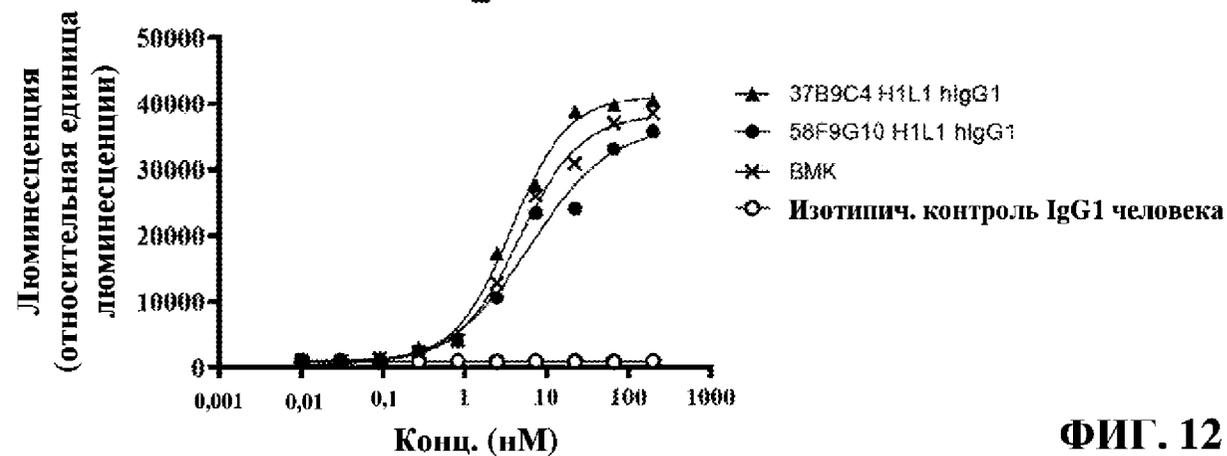
ФИГ. 11 (продолж.)

Линии клеток со сверхэкспрессией GPRC5D

CHO-K1/H_GPRC5D

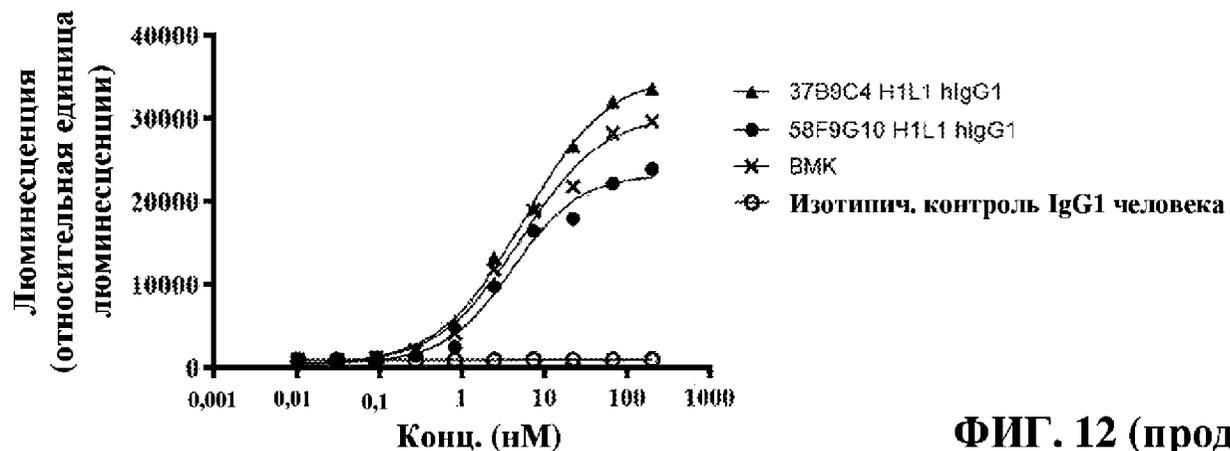
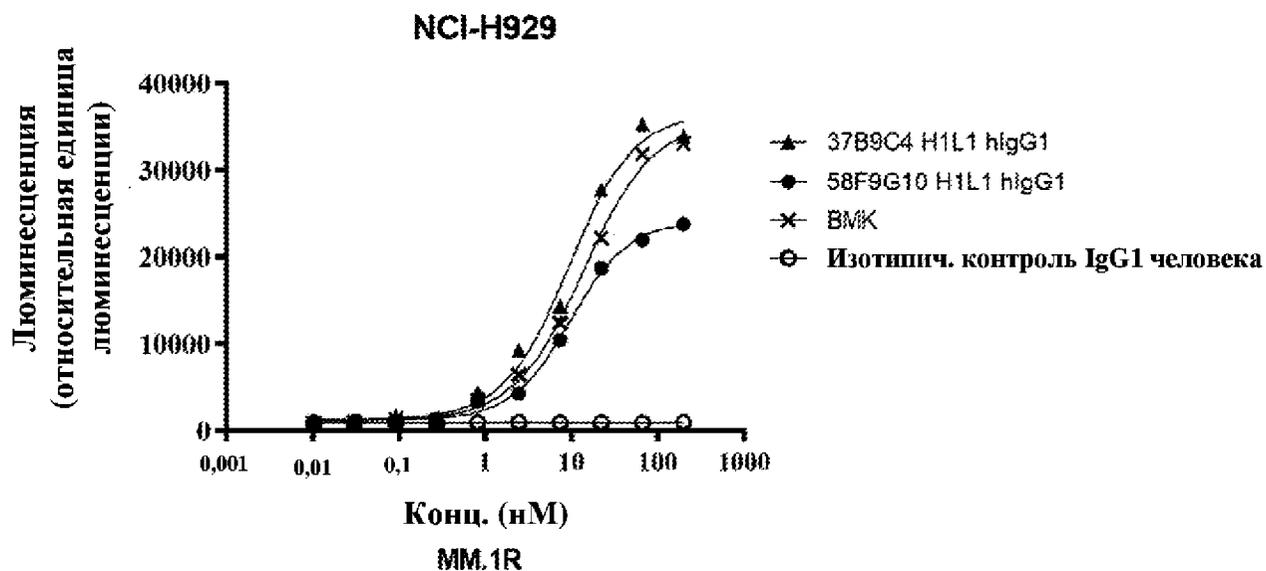


HEK-293/H_GPRC5d

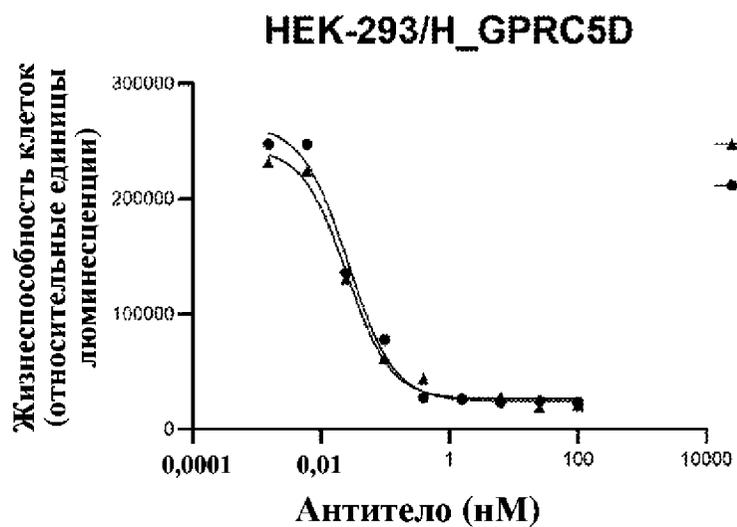


ФИГ. 12

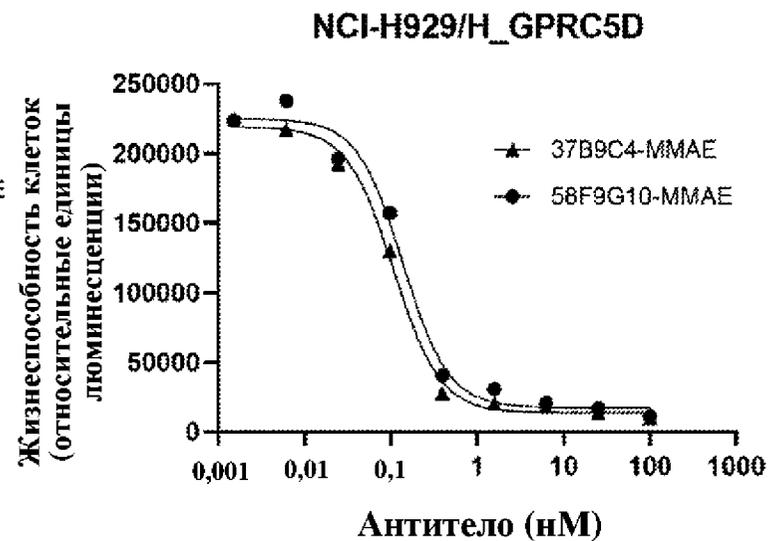
Линии клеток ММ с эндогенной экспрессией



ФИГ. 12 (продолж.)

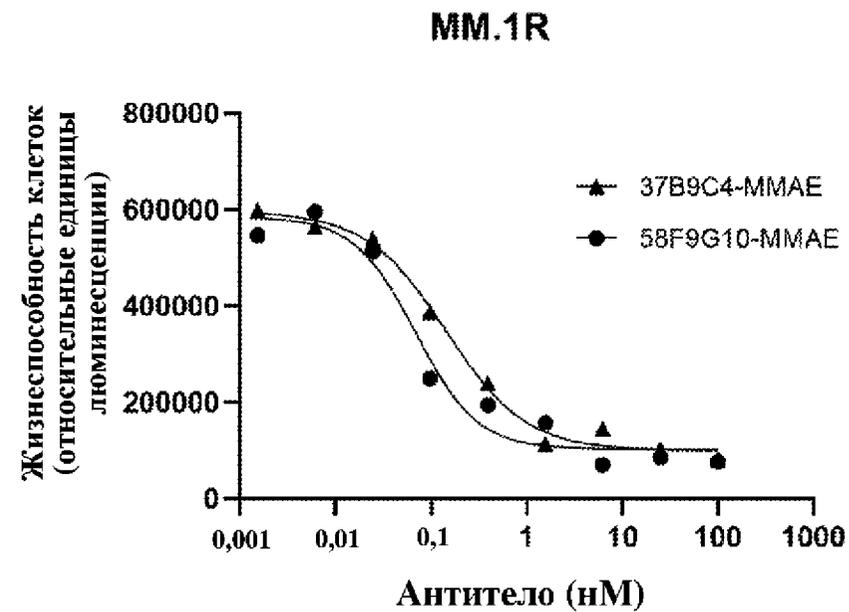
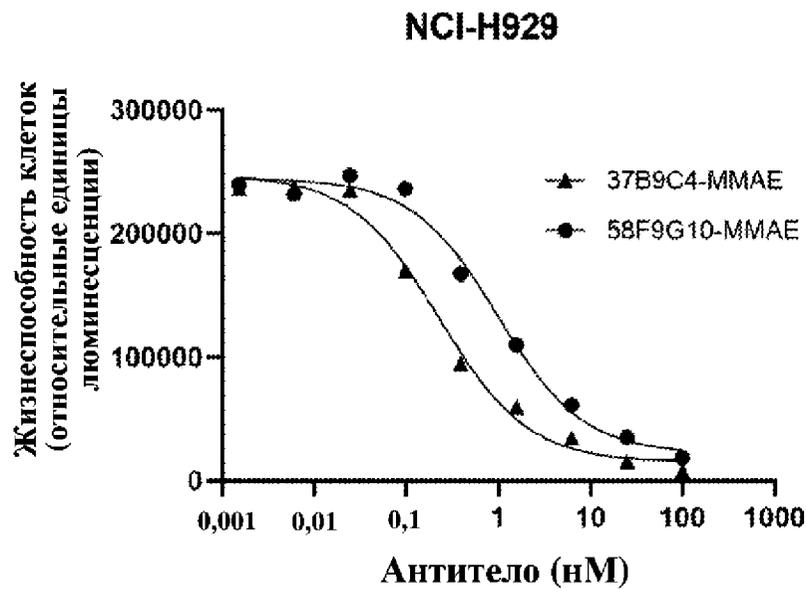


GM-79



GM-101

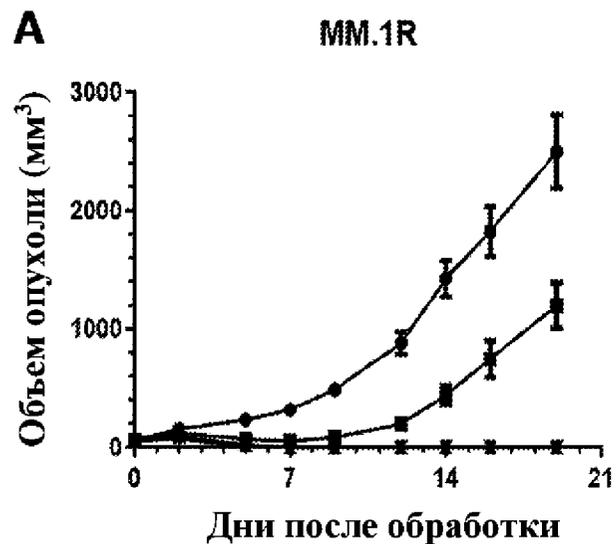
ФИГ. 13



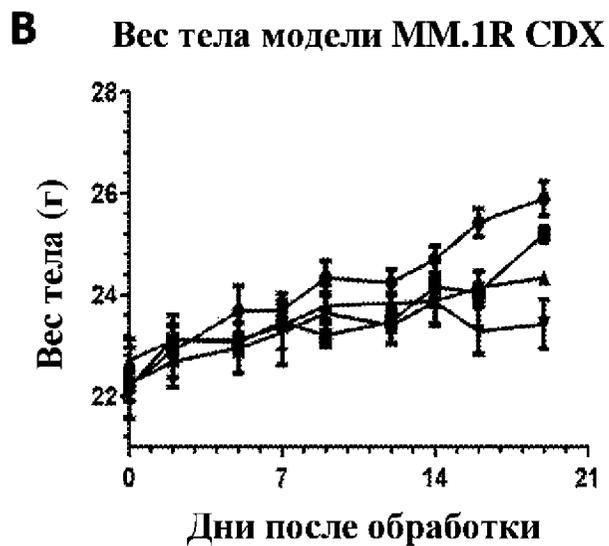
GM-101

GM-103

ФИГ. 13 (продолж.)



- G1: PBS, в/в один раз в неделю
- G2: LM-305, 1 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю
- ▲ G3: LM-305, 3 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю
- ▼ G4: LM-305, 10 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю



- G1: PBS, в/в один раз в неделю
- G2: LM-305, 1 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю
- ▲ G3: LM-305, 3 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю
- ▼ G4: LM-305, 10 мг/кг веса тела в/в один раз в неделю

ФИГ. 14