

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392622 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.26

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.14

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА

(31) 202110405638.3

(32) 2021.04.15

(33) CN

(86) PCT/CN2022/086842

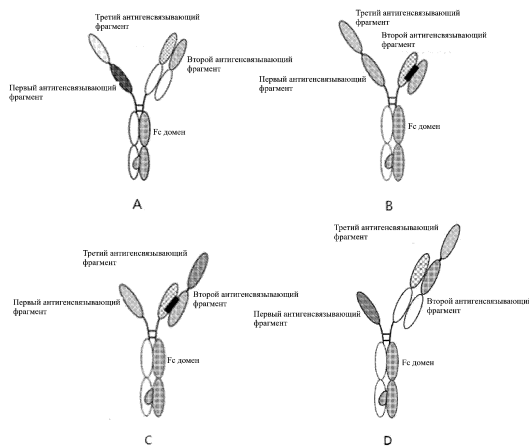
(87) WO 2022/218380 2022.10.20

(71) Заявитель:  
ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,  
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:  
Чжан Бин, Чжао Вэй, Лу Яминь, Ду  
Минь, Чжэнь Цзыпэн, Се Мэйцзюань,  
Ван Синь, Си Цзюньсяо, Сун Синь,  
Ду Сючжэнь (CN)

(74) Представитель:  
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Предложено мультиспецифическое антитело, нацеленное на ВСМА (антиген созревания В-клеток). В частности, предложены мультиспецифическое антитело, нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая указанный вектор, и фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело. Дополнительно предложено их применение для лечения субъекта, страдающего от заболевания, связанного с экспрессией ВСМА (антиген созревания В-клеток).



A1

202392622

202392622

A1

## МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу и, в частности, к мультиспецифическому антителу, нацеленному на ВСМА (антиген созревания В-клеток).

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антиген созревания В-клеток (ВСМА), также известный как член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), представляет собой белок, который у человека кодируется геном TNFRSF17.

BAFF (фактор активации В-клеток) и APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию) являются лигандами для ВСМА. BAFF (также известный как BLYS, TALL-1, THANK, zTNF4, TNFSF20 или D8Ert387e) представляет собой высокоаффинный лиганд для ВСМА. APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию, также известный как TNFSF13, TALL-2 или TRDL-1) представляет собой низкоаффинный лиганд для ВСМА. Кроме того, BAFF и APRIL также являются лигандами для рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), входящего в состав суперсемейства рецепторов фактора активации В-клеток (BAFF-R), и для трансмембранного активатора и партнёра кальциевого модулятора и лиганда циклофилина (TACI). ВСМА вместе с BAFF-R и TACI регулирует пролиферацию, выживание, созревание и дифференцировку В-клеток.

Множественная миелома представляет собой злокачественное заболевание плазматических клеток. В клетках множественной миеломы уровень экспрессии ВСМА значительно повышен. ВСМА может быть подходящей мишенью опухолевого антигена для иммунотерапевтических агентов при множественной миеломе. Иммунотерапевтические агенты, такие как антитела, которые связываются с ВСМА, способны блокировать связывание ВСМА с его естественным лигандом BAFF и/или APRIL.

В дополнение к обычным антителам IgG1 четырехцепочечной структуры, содержащим легкие цепи и тяжелые цепи, антитела IgG у животных семейства Camelidae также включают встречающиеся в природе антитела из тяжелых цепей IgG2 и IgG3 (HcAb), не содержащие легких цепей. Одиночные домены вариабельной области (V<sub>H</sub>H или одиночные вариабельные домены) антител с тяжелой цепью имеют характеристики

специфического связывания с антигенами и имеют относительно высокую аффинность к антигенам. Основываясь на их уникальности, домены  $V_{\text{H}}\text{H}$ , используемые отдельно или в составе более крупной антигенсвязывающей молекулы, имеют более значительные преимущества по сравнению с обычными scFv и фрагментами антител, такими как Fab: например, для специфического связывания с антигеном с высокой аффинностью требуется только одиночный домен; они могут быть трансформированы в поливалентные и мультиспецифические форматы; домены  $V_{\text{H}}\text{H}$  хорошо растворимы и не склонны к агрегации; молекулы малы и, таким образом, демонстрируют относительно высокую тканевую проницаемость; однодоменные антитела не нужно спаривать с легкими цепями, и, таким образом, нет проблемы несоответствия легких и тяжелых цепей при образовании мультиспецифических антител и т. п.

Мультиспецифические антитела, нацеленные на антиген созревания В-клеток (BCMA) и рецептор CD3 Т-клеток, могут перенацеливать CD3 Т-клетки на клетки миеломы, экспрессирующие BCMA, для индуцирования цитотоксичности против клеток-мишеней.

В качестве потенциальной терапевтической мишени были разработаны некоторые антитела, нацеленные на BCMA, но они все еще ограничены. Необходимы более доступные варианты.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителу, нацеленному на BCMA и относится к мультиспецифическому антителу, нацеленному на BCMA, и активирующему Т-клеточному антигену, такому как CD3. В настоящем изобретении также предложены родственные нуклеиновые кислоты, которые могут кодировать предложенное антитело, вектор, клетку, композицию, способ получения и применение.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему

- (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;
- (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антигеном; и
- (iii) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

где первый антиген представляет собой BCMA и второй антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген, и первый антигенсвязывающий фрагмент и

третий антигенсвязывающий фрагмент оба являются одиночными вариабельными доменами и каждый независимо содержит любую из:

(a) CDR1 (определяющая комплементарность область 1), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или

(d) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления данный каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит любую из:

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и третий антигенсвязывающий

фрагмент, содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42. В некоторых конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41. В некоторых конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент связываются с различными эпитопами ВСМА.

Второй антигенсвязывающий фрагмент обеспечивает способность связываться с активирующим Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит следующие определяющие комплементарность области: HCDR1 (CDR1 тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; переменная область легкой цепи содержит LCDR1 (CDR1 легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48. В дополнительных конкретных вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело дополнительно содержит Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления в мультиспецифическом антителе первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит следующие определяющие комплементарности области: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; переменную легкую цепь область содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48. В дополнительных конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, третий антигенсвязывающий фрагмент содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В дополнительных конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В конкретных вариантах осуществления в выбранной конфигурации первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента. В дополнительном более конкретном варианте осуществления указанное мультиспецифическое антитело состоит из двух полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и вторая полипептидная цепь содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше.

В других конкретных вариантах осуществления в мультиспецифическом антителе третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит

следующие определяющие комплементарность области: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; переменную легкую цепь область содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48. В дополнительных конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В дополнительных конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область ее легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В вариантах осуществления в выбираемой конфигурации первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Для варианта осуществления в дополнительных более конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело состоит из трех полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, вторая полипептидная цепь содержит Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего



фрагмента и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и третья полипептидная цепь представляет собой Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше. В другой выбираемой конфигурации первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Для варианта осуществления, в дополнительных более конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело состоит из двух полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и вторая полипептидная цепь содержит второй антигенсвязывающий фрагмент и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше. В другой выбираемой конфигурации первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Для варианта осуществления в дополнительных более конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело состоит из трех полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, вторая полипептидная цепь содержит Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и третья полипептидная цепь содержит третий антигенсвязывающий фрагмент и Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей полинуклеотид, кодирующий мультиспецифическое антитело.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту или вектор, описанный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ получения мультиспецифического антитела, описанного в настоящем документе, включающий культивирование клетки-хозяина для экспрессии мультиспецифического антитела и выделение и очистку мультиспецифического антитела в системе.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую мультиспецифическое антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает ВСМА-связывающее антитело, содержащее одиночный вариабельный домен, где одиночный вариабельный домен содержит:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41 или 42, в то

время как указанный одиночный вариабельный домен не содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или 23.

Настоящее изобретение предлагает мультиспецифическое антитело, направленное на ВСМА, и активирующему Т-клеточному антигену, такому как CD3. В некоторых вариантах осуществления различные формы мультиспецифического антитела были сконструированы с использованием определенных одиночных вариабельных доменов, каждый из которых демонстрирует хороший противоопухолевый эффект, такой как эффективность и безопасность лизиса опухолевых клеток.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1A показаны кривые анализов проточной цитометрии на связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека с клетками CHO-hBCMA.

На фиг. 1B показаны кривые анализов проточной цитометрии на связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека с клетками U266.

На фиг. 1C показаны кривые анализов проточной цитометрии на связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека с клетками RPMI8226.

На фиг. 1D показаны кривые анализов проточной цитометрии на связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека с клетками HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека).

На фиг. 2 показаны кривые анализов проточной цитометрии на связывание химерных антител 1A10-Fc и 1A11-Fc с HEK293T-CynoBCMA или HEK293T.

На фиг. 3 показаны результаты конкурентных анализов ELISA для химерного антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека и лиганда APRIL.

На фиг. 4A показано сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточных областей ВСМА человека и ВСМА яванского макака.

На фиг. 4B показана кристаллическая структура внеклеточной области ВСМА человека.

На фиг. 5 представляет собой структурный схематический вид примерных мультиспецифических антител по настоящему изобретению.

На фиг. 6 представляет собой структурный схематический вид иллюстративных антител BC24, PC1, PC2 и PC3.

На фиг. 7 показаны кривые связывания мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с клетками NCI-H929.

На фиг. 8 показаны кривые связывания мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с клетками MM1S.

На фиг. 9 показаны кривые связывания мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с клетками RPMI-8226.

На фиг. 10 показаны кривые связывания мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с CD3<sup>+</sup> Т-клетками.

На фиг. 11 показана степень лизиса опухолевых клеток NCI-H929 эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к ВСМА/к CD3 в различных концентрациях.

На фиг. 12 показана степень лизиса опухолевых клеток MM1S эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к ВСМА/к CD3 в различных концентрациях.

На фиг. 13 показана степень лизиса опухолевых клеток RPMI-8226 эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к ВСМА/к CD3 в различных концентрациях.

На фиг. 14 показано влияние мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 на активацию Т-клеток в присутствии клеток-мишеней NCI-H929.

На фиг. 15 показано влияние мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 на активацию Т-клеток в присутствии клеток-мишеней MM1S.

На фиг. 16 показано количество высвобождаемых цитокинов IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли-альфа) и IFN- $\gamma$  (интерферон-гамма) после инкубации различных концентраций антител к ВСМА/к CD3 с клетками NCI-H929 и эффекторными клетками в течение 24 часов.

На фиг. 17 показано влияние антител к ВСМА/к CD3 на рост подкожных ксенотрансплантатных опухолей NCI-H929.

На фиг. 18 показаны результаты анализа LC-MS (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией) антитела PC1 к ВСМА/к CD3.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Терминология

Термин «антитело» относится к белку, содержащему антигенсвязывающий сайт, и включает естественные и искусственные антитела различных структур, включая, но не ограничиваясь ими, моноклональные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела и т. п.), одноцепочечные антитела и т. п.

Термин "мультиспецифический" означает, что антитело способно специфически связываться с множеством различных антигенных детерминант, например, способно

специфически связываться с двумя или более различными антигенными детерминантами. Как правило, биспецифическое антитело содержит два антигенсвязывающих сайта, каждый из которых специфичен для различной антигенной детерминанты. Различные антигенные детерминанты могут быть экспрессированы на одних и тех же или разных клетках. Различные антигенные детерминанты могут различаться в зависимости от разных типов антигенов (например, связывание с антигенами CD3 и BCMA) или могут присутствовать на одном и том же антигене. Антигенная детерминанта представляет собой специальную химическую группу с определенным составом и структурой на поверхности или других частях молекулы антигенного вещества, которая может специфически связываться с соответствующим ей антителом или сенсibilизированным лимфоцитом. Примером антигенной детерминанты является антиген созревания В-клеток (BCMA), который представляет собой антигенное вещество, имеющее различные структурно определенные или структурно неопределенные антигенные детерминанты. Антитела, которые связываются с двумя или более различными антигенными детерминантами на антигене, упоминаются в настоящем документе как мультиспецифические антитела.

Термин «N-валентное антитело» предназначен для указания количества N антигенсвязывающих сайтов в антителе. Например, «двухвалентное антитело» относится к наличию двух антигенсвязывающих сайтов в антителе, и «трехвалентное антитело» относится к наличию трех антигенсвязывающих сайтов в антителе. Молекула естественного иммуноглобулина человека, как правило, имеет два антигенсвязывающих сайта, и Fab, как правило, имеет одиночный антигенсвязывающий сайт. Одиночный переменный домен и ScFv обычно имеют одиночный антигенсвязывающий сайт.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к молекуле полипептида, специфически связывающейся с антигенной детерминантой. Специфический антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой Fab, ScFv или одиночный переменный домен. Антигенная детерминанта является синонимом эпитопа антигена в настоящем документе.

Термин «активирующий T-клеточный антиген» относится к антигену, экспрессируемому на поверхности T-лимфоцита, такому как цитотоксический T-лимфоцит, который при взаимодействии с антителом способен индуцировать активацию T-клеток. Например, взаимодействие антитела с активирующим T-клеточным антигеном может индуцировать активацию T-клеток путем запуска сигнального каскада комплекса T-клеточных рецепторов. В конкретном варианте осуществления данного изобретения активирующий T-клеточный антиген представляет собой CD3, например,  $\epsilon$ -субъединицу

CD3.

Термин «активация Т-клеток» относится к одному или более клеточным ответам Т-лимфоцита, такого как цитотоксический Т-лимфоцит, выбранных из группы, состоящей из пролиферации, дифференцировки, секреции цитокинов, высвобождения цитотоксических эффекторных молекул, цитотоксической активности, экспрессии маркеров активации и т. п. Мультиспецифическое антитело, раскрытое в настоящем документе, способно индуцировать активацию Т-клеток. Подходящие способы измерения активации Т-клеток известны в данной области техники и описаны в настоящем документе.

Термины «первый», «второй» или «третий», используемые в настоящем документе в отношении антигенсвязывающего фрагмента, антигена, Fc-полипептида, пептидного линкера, полипептидной цепи и т. п. используются для простоты различения, когда присутствует одна или более частей каждого типа. Если специально не указано иное, использование этих терминов не предназначено для придания конкретного порядка или ориентации мультиспецифическому антителу.

Термин "слияние" означает, что компоненты (например, Fab, ScFv, Fc-полипептид и т. д.) связаны либо напрямую, либо посредством пептидных связей через один или более пептидных линкеров.

Термин "вариабельный домен" или "вариабельная область" относится к домену антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Например, природное четырехцепочечное антитело (например, полученное от человека, мыши и т. п.) имеет вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), и антитело из тяжелых цепей, полученное от животного, такого как верблюд или акула, имеет одиночный вариабельный домен. Каждый вариабельный домен природного антитела состоит по существу из четырех «каркасных областей» и трех «определяющих комплементарность областей». Четыре каркасные области называются каркасной областью 1 (или FR1), каркасной областью 2 (или FR2), каркасной областью 3 (или FR3) и каркасной областью 4 (или FR4), соответственно. Каркасные области разделены тремя определяющими комплементарность областями (или CDR), упомянутыми в данной области техники и далее как определяющая комплементарность область 1 (или CDR1), определяющая комплементарность область 2 (или CDR2) и определяющая комплементарность область 3 (или CDR3), соответственно. Таким образом, общая структура вариабельного домена может быть представлена следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные домены придают антителу специфичность к антигену благодаря наличию антигенсвязывающего сайта.

Термин «одиночный вариабельный домен» относится к вариабельному домену,

способному специфически связываться с эпитопом антигена без спаривания с другими переменными доменами. Одиночный переменный домен обычно имеет три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) и присутствует на одиночном домене. В некоторых случаях одиночный переменный домен может представлять собой переменный домен тяжелой цепи (например, VH), если он может образовывать одиночную антигенсвязывающую единицу (т.е. функциональную антигенсвязывающую единицу, состоящую по существу из одиночного переменного домена; таким образом, одиночный антигенсвязывающий домен может образовывать функциональную антигенсвязывающую единицу без взаимодействия с другим переменным доменом). Другим примером одиночного переменного домена является «домен VHH» (или просто «VHH» или «V<sub>H</sub>H») семейства Camelidae.

«CDR» (определяющая комплементарность область), также известная как «гиперпеременная область (HVR)», обычно относится к каждой области переменных областей антитела, которые являются высокопеременными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Природное четырехцепочечное антитело обычно содержит шесть CDR, три в переменной области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три в переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Антитело с тяжелой цепью или одиночный переменный домен обычно имеет три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3).

В настоящее время существует множество способов определения CDR. Схема по Кабату определяет CDR на основе изменчивости последовательностей и является наиболее часто используемой (Elvin A. Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), в то время как схема по Чотиа определяет CDR на основе положения структурных петель (Cyrus Chothia, et al, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)). Схема AbM (агентное моделирование), компромисс между схемой по Кабату и схемой по Чотиа, используется программным обеспечением AbM компании Oxford Molecular для моделирования антител. «Контакт» (Contact) определяет CDR на основе анализа кристаллической структуры доступных комплексов. Однако следует отметить, что границы CDR переменных областей одного и того же антитела на основании разных способов и определений могут отличаться, т. е. последовательности CDR переменных областей одного и того же антитела, определенные разными способами, могут отличаться. Таким образом, когда делается ссылка на антитело, определенное с конкретной последовательностью CDR, определенной в настоящем документе, объем антитела также охватывает антитела, определенные

последовательностями CDR, которые преобразуются в другие произвольные определения (например, определения Chothia, AbM и т. п.).

Последовательности CDR, приведенные в настоящем документе, как правило, определены в соответствии со схемой по Кабату (Elvin A. Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Термин «каркасная область» или «FR» относится к аминокислотным остаткам переменных доменов, отличных от остатков CDR, определенных в настоящем документе.

Термин "Fab" относится к белку, состоящему из доменов VH и CH1 тяжелой цепи и доменов VL и CL легкой цепи иммуноглобулина. Fab в настоящем документе относится к молекуле Fab в ее естественной форме, то есть содержащей Fab тяжелой цепи, состоящего из переменной области тяжелой цепи VH и константной области CH1 (VH-CH1, в направлении от N-конца к C-концу), и Fab легкой цепи, состоящего из переменной области легкой цепи и константной области CL (VL-CL, в направлении от N-конца к C-концу).

Термин "scFv" включает домены VH и VL иммуноглобулина, причем данные домены присутствуют в одиночной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv дополнительно содержит пептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать необходимую структуру для связывания антигена.

Термин "Fc-домен" или "Fc" используется в настоящем документе для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает природную последовательность Fc и вариант Fc. Тем не менее, C-концевой участок лизина (Lys447) Fc может присутствовать или не присутствовать. Если не указано иное, аминокислотные остатки в Fc или константной области пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU (Евросоюз), также называемой EU-индексом, как описано в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242. В данном контексте «Fc-полипептид» Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, которые образуют димерный домен Fc. Например, Fc-полипептид Fc-домена IgG содержит константные области CH2 IgG и CH3 IgG.

Термин «эффektorная функция» относится к биологической активности, относящейся к Fc-домену антитела, которая варьируется в зависимости от изоформ



антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и т. п.

В данном контексте термин "KD" относится к константе диссоциации, выраженной в молярной концентрации (M). Значение KD антитела может быть определено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, способ определения KD антитела заключается в использовании поверхностного плазмонного резонанса, например, в использовании биосенсорной системы, такой как система Viacore.

Термин «лечение» или «обработка» относится к попытке изменить естественное течение заболевания у субъекта, получающего лечение, и может представлять собой клиническое вмешательство, выполняемое для профилактики или в ходе клинической патологии. Желаемые терапевтические эффекты включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или рецидива заболеваний, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических исходов заболеваний, предотвращение метастазирования, замедление темпов прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение патологических состояний и регрессию или улучшение прогноза.

Термин «субъект» включает любого человека или животное, не являющееся человеком. Термин «животное, не являющееся человеком» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, земноводные и рептилии. Предпочтительно, субъект согласно настоящему изобретению представляет собой человека. Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо, если не указано иное.

Термин «выделенный» означает, что представляющее интерес соединение (например, VHH, мультиспецифическое антитело, антитело или нуклеиновая кислота) было выделено из его естественной среды.

«Процент идентичности (%)» аминокислотной последовательности относится к проценту аминокислотных остатков в выравниваемой последовательности, которые идентичны остаткам конкретной аминокислотной последовательности, как указано в настоящем документе, когда выравниваемая последовательность выравнивается с конкретной аминокислотной последовательностью, как указано в настоящем документе, с гэпами, введенными, при необходимости, для достижения максимального процента

идентичности последовательности и без каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание аминокислотных последовательностей для идентичности может быть выполнено различными способами в данной области техники, такими как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для получения максимального выравнивания для всей длины сравниваемых последовательностей.

Различные аспекты настоящего изобретения будут описаны более подробно в последующих разделах.

#### I. Одиночный вариабельный домен

В настоящем изобретении предложен одиночный вариабельный домен, который связывается с ВСМА (например, ВСМА человека). Одиночный вариабельный домен обеспечивает более доступные варианты для разработки или создания лекарственных средств, нацеленных на ВСМА. Одиночный вариабельный домен обладает хорошим сродством к ВСМА человека и может обеспечивать нацеливающее свойство. В некоторых случаях одиночный вариабельный домен способен обеспечивать способность блокировать связывание лиганда, индуцирующего пролиферацию, APRIL с ВСМА. В частности, в некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен не связывается с белками человека TACI и BAFF-R, проявляя специфичность; в некоторых вариантах осуществления наблюдаются перекрестные реакции с ВСМА обезьян, которые являются полезными для экспериментов по токсикологии лекарственного средства, поскольку обезьяны являются идеальным экспериментальным животным для экспериментов по токсикологии лекарственного средства.

Настоящее изобретение предлагает ВСМА-связывающий одиночный вариабельный домен, содержащий:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен получен из животных семейства Camelidae. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен является гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39, 40, 41 или 42. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, и содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41, и содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37 или 38, и содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, и содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39 или 40, и содержит: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых более конкретных вариантах осуществления одиночный варибельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, и содержит: CDR1, содержащую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную по сравнению с эталонной последовательностью содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции; однако одиночные переменные домены, содержащие указанную последовательность, сохраняют способность связываться с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности 1-18, 1-16, 1-14, 1-12, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 аминокислоты замещены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 19, 41, 42 и 25. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции осуществляются в областях за пределами CDR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях CDR, например, в одной, двух или трех из CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции осуществляются в CDR-областях и не-CDR-областях.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одиночного переменного домена содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39, 40, 41 или 42.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одиночного переменного домена представлена в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39, 40, 41 или 42.

В некоторых вариантах осуществления одиночный переменный домен представляет собой  $V_HH$ . В некоторых вариантах осуществления  $V_HH$  является гуманизированным. Одиночный переменный домен нечеловеческого происхождения может быть «гуманизован» путем замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности исходной последовательности одиночного переменного домена одним или более аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующих положениях в  $VH$ -доме человеческого антитела. Гуманизация может быть желательной для снижения иммуногенности. Как правило, одиночный переменный домен имеет следующую структуру от N-конца до C-конца: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает одиночный переменный домен, который связывается с тем же эпитопом, что и любой из одиночных переменных доменов, описанных в настоящем документе. В некоторых

конкретных вариантах осуществления предложен одиночный вариабельный домен, который связывается с теми же эпитопами, что и одиночный вариабельный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39 или 40. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен, который связывается с одними и теми же эпитопами, получен от животных семейства Camelidae или является гуманизированным.

На основании конкурентного связывания с одними и теми же эпитопами скрининг одиночных вариабельных доменов может быть проведен с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает одиночный вариабельный домен, который конкурирует за связывание с ВСМА с любым из одиночных вариабельных доменов, описанных в настоящем документе. В некоторых конкретных вариантах осуществления предложен одиночный вариабельный домен, который конкурирует за связывание с ВСМА с одиночным вариабельным доменом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39 или 40. Связывание с ВСМА может быть измерено с помощью ELISA (иммуноферментный анализ), проточной цитометрии или анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или любого другого способа, известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен, который конкурирует за связывание с ВСМА, получен от животных семейства Camelidae или гуманизирован.

Настоящее изобретение предлагает некоторые примерные ВСМА-связывающие одиночные вариабельные домены. Аминокислотные последовательности CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) примерных одиночных вариабельных доменов, предложенных в настоящем документе, представлены в таблице S1 ниже. Полноразмерные аминокислотные последовательности примерных одиночных вариабельных доменов представлены в таблице S2 ниже.

Таблица S1. Последовательности CDR одиночных вариабельных доменов

Наименование	CDR1	CDR2	CDR3
Одиночный вариабельный домен	GWNKH (SEQ ID NO: 7)	SIFRDGKTA YTDSVK G (SEQ ID NO: 8)	DLPGSGLP AF (SEQ ID NO: 9)

1A1			
Одиночный вариабельный домен 1A10	VACMA (SEQ ID NO: 10)	TIVADFGTTNYAASV KG (SEQ ID NO: 11)	TQGGIDWCDEINY (SEQ ID NO: 12)
Одиночный вариабельный домен 1A10-V1	VACMA (SEQ ID NO: 10)	TIVADFGTTNYAASV KG (SEQ ID NO: 11)	TQGGIDWCDEINY (SEQ ID NO: 12)
Одиночный вариабельный домен 1A10-V2	VACMA (SEQ ID NO: 10)	TIVADFGTTNYAASV KG (SEQ ID NO: 11)	TQGGIDWCDEINY (SEQ ID NO: 12)
Одиночный вариабельный домен 1A11	SACMG (SEQ ID NO: 13)	RIETGYGGTVYADS VKG (SEQ ID NO: 14)	KRSWCTPTWWHELD YNY (SEQ ID NO: 15)
Одиночный вариабельный домен 1A11-V1	SACMG (SEQ ID NO: 13)	RIETGYGGTVYADS VKG (SEQ ID NO: 14)	KRSWCTPTWWHELD YNY (SEQ ID NO: 15)
Одиночный вариабельный	SACMG (SEQ ID NO: 13)	RIETGYGGTVYADS VKG (SEQ ID NO: 14)	KRSWCTPTWWHELD YNY (SEQ ID NO: 15)

1A11-V2 домен			
Одиночный вариабельный домен 1B10	GWNKH (SEQ ID NO: 16)	SIFRDGKTAYTDSVK G (SEQ ID NO: 17)	DLPGSGLPEF (SEQ ID NO: 18)

Таблица S2. Полноразмерные последовательности одиночных вариабельных доменов

Наименование	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Одиночный вариабельный домен 1A1	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKH WYRQAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQ DNADATVYQLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLP AFWGQGTLVTVSS	19
Одиночный вариабельный домен 1A10	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSSNVACMA WYRQAPGKEREWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTI SQDNAKNTVYQLQMNSLKPEDSAMYYCAATQRGGID WCDEINYWGQGTLVTVSS	21
Одиночный вариабельный домен 1A11	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTFNSACMG WFRQAPGKEREGVARIETGYGGTVYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTP TWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	23
Одиночный вариабельный	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKH WYRQAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQ DSADATVYQLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLPE FWGQGTLVTVSS	25



домен 1B10		
Одиночный вариабельный домен 1A10-V1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMA WYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTI SQDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGID WCDEINYWGQGLVTVSS	37
Одиночный вариабельный домен 1A10-V2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMA WYRQAPGKEREWVSTIVADFGTTNYAASVKGRFTIS QDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGID WCDEINYWGQGLVTVSS	38
Одиночный вариабельный домен 1A11-V1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMG WFRQAPGKGREGVSRITGYGGTVYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAKRSWCTP TWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	39
Одиночный вариабельный домен 1A11-V2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMG WFRQAPGKEREGVSRITGYGGTVYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLMNSLKAEDTAVYYCAAKRSWCTP TWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	40

Последовательность SEQ ID NO: 41:

QVQLVESGGGX<sub>1</sub>VQX<sub>2</sub>GGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>EWVX<sub>5</sub>  
TIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNX<sub>6</sub>KNTVYLMNSLX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>EDX<sub>9</sub>AX<sub>10</sub>YYCAATQRGGI  
DWCDEINYWGQGLVTVSS

где X<sub>1</sub> представляет собой S или L, X<sub>2</sub> представляет собой P или A, X<sub>3</sub> представляет собой G или E, X<sub>4</sub> представляет собой R или L, X<sub>5</sub> представляет собой A или S, X<sub>6</sub> представляет собой A или S, X<sub>7</sub> представляет собой R или K, X<sub>8</sub> представляет собой A или P, X<sub>9</sub> представляет собой T или S и X<sub>10</sub> представляет собой V или M.

Последовательность SEQ ID NO: 42:

QVQLVESGGGX<sub>11</sub>VQX<sub>12</sub>GGSLRLSCAASGX<sub>13</sub>TFNSACMGWFRQAPGKX<sub>14</sub>REGV  
X<sub>15</sub>RIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNX<sub>16</sub>KNTVYLQMNSLX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>EDTAX<sub>19</sub>YYCAAKRS  
WCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS

где X<sub>11</sub> представляет собой S или L, X<sub>12</sub> представляет собой P или A, X<sub>13</sub> представляет собой F или V, X<sub>14</sub> представляет собой E или G, X<sub>15</sub> представляет собой A или S, X<sub>16</sub> представляет собой A или S, X<sub>17</sub> представляет собой R или K, X<sub>18</sub> представляет собой A или P, и X<sub>19</sub> представляет собой V или M.

Настоящее изобретение относится к ВСМА-связывающему антителу, содержащему одиночный вариабельный домен.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающее антитело может представлять собой моноспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело.

В одном варианте осуществления моноспецифическое антитело содержит Fc-домен; предпочтительно, Fc представляет собой Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления моноспецифическое антитело содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 51, 53, 55 или 57.

Настоящее изобретение предлагает примерные моноспецифические антитела (например, 1A10-V1, 1A10-V1, 1A11-V1, 1A11-V2 и т. п.). Одиночный вариабельный домен слит с Fc IgG1 человека с образованием гомодимера через Fc.

Настоящее изобретение предлагает выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий ВСМА-связывающее антитело, описанное в настоящем документе.

Настоящее изобретение предлагает вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе.

Настоящее изобретение предлагает выделенную клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, или вектор, описанный в настоящем документе.

Настоящее изобретение предлагает способ получения ВСМА-связывающего антитела, описанного в настоящем документе, включающий культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящем документе, для экспрессии ВСМА-связывающего антитела и выделение и очистку ВСМА-связывающего антитела в системе.

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую ВСМА-связывающее антитело, описанное в настоящем документе, и фармацевтически

приемлемый носитель.

Настоящее изобретение предлагает способ лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ВСМА-связывающего антитела или фармацевтической композиции, описанного в настоящем документе.

## II. Мультиспецифическое антитело

Настоящее изобретение предлагает мультиспецифическое антитело, содержащее одиночный вариабельный домен, который может нацеливаться на ВСМА, экспрессируемый на поверхности опухолевой клетки, и также может связываться с Т-клеткой для активации активности Т-клетки к лизису опухоли.

С одиночным вариабельным доменом несоответствия между легкой и тяжелой цепями могут быть уменьшены или предотвращены по сравнению с формами с большим количеством (например, двумя) Fab.

Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, также проявляет превосходные противоопухолевые свойства, такие как лизис опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, способно индуцировать лизис различных опухолевых клеток, и описанное в настоящем документе мультиспецифическое антитело демонстрирует хорошую активность лизиса опухолей в отношении опухолевых клеток с различными уровнями экспрессии ВСМА. В частности, мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, демонстрирует более высокую эффективность лизиса некоторых опухолевых клеток с низкой экспрессией в ВСМА.

Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, имеет низкий уровень высвобождения цитокинов, демонстрируя при этом хорошие противоопухолевые характеристики, может снизить риск цитокинового шторма, вызванного антителом, нацеленным на CD3, и повышает безопасность.

Мультиспецифическое антитело может быть сконструировано с использованием любого из одиночных вариабельных доменов, описанных в разделе I. Таким образом, настоящее изобретение предлагает мультиспецифическое антитело, содержащее

- (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;
- (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антигеном; и
- (iii) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

где первый антиген представляет собой ВСМА и второй антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген, и первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба являются одиночными переменными доменами и каждый независимо содержит любую из:

(a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или

(d) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В настоящем изобретении первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой ВСМА-связывающие одиночные переменные домены. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (a), (b), (c) или (d) выше. В некоторых вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (a), (b), (c) или (d) выше. В мультиспецифическом антителе первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент могут быть идентичными или различными, и любой одиночный переменный домен, описанный в настоящем документе, может быть независимо выбран для комбинации; в конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент являются идентичными; в другом конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент отличается от третьего антигенсвязывающего фрагмента.

Мультиспецифические антитела, сконструированные с различными комбинациями

первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента с определенным признаком CDR, иллюстративно перечислены в таблице S3. В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (b) выше, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (c) выше, то есть первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В другом конкретном варианте осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (b) выше, и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (c) выше, то есть третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В более конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 12; и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 15. В другом более конкретном варианте осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 12; и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 15.

Таблица S3. Примерные мультиспецифические антитела, в которых определен признак CDR первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента

Первый антигенсвязывающий фрагмент \ Третий антигенсвязывающий фрагмент	(a)	(b)	(c)	(d)
(a)	(a)+(a)	(a)+(b)	(a)+(c)	(a)+(d)
(b)	(b)+(a)	(b)+(b)	(b)+(c)	(b)+(d)
(c)	(c)+(a)	(c)+(b)	(c)+(c)	(c)+(d)
(d)	(d)+(a)	(d)+(b)	(d)+(c)	(d)+(d)

Примечание: в таблице (X) + (Y) указывает на комбинацию третьего антигенсвязывающего фрагмента и первого антигенсвязывающего фрагмента мультиспецифического антитела. Например, (b) + (a) указывает на то, что третий антигенсвязывающий фрагмент мультиспецифического антитела содержит определяющую комплементарность область, описанную в (b), в то время как первый антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область, описанную в (a).

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 41, 42 или 25.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 41, 42 или 25. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 37, 38, 39, 40 или 25. В некоторых конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 41, 42

или 25. В некоторых более конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 37, 38, 39, 40 или 25.

В некоторых вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 41, 42 или 25. В некоторых вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 37, 38, 39, 40 или 25. В некоторых конкретных вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 41, 42 или 25. В некоторых более конкретных вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 37, 38, 39, 40 или 25.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42. В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42. В некоторых более конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, 37 или 38 а третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, и третий антигенсвязывающий

фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41. В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41. В некоторых более конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, 37 или 38.

В одном примере первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, 23, 37, 38, 39 или 40.

В одном примере третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, 23, 37, 38, 39 или 40.

В одном примере первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.

В одном примере первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

В одном примере первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40.

В одном примере первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39.





Таблица S4 иллюстрирует мультиспецифические антитела, сконструированные с различными комбинациями первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента с признаком полноразмерной аминокислотной последовательности.

Таблица S4. Примерные мультиспецифические антитела, в которых определены аминокислотные последовательности первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента

Первый антигенсвязывающий фрагмент	Одиночный вариабельный домен 1A1	Одиночный вариабельный домен 1A10	Одиночный вариабельный домен 1A11	Одиночный вариабельный домен 1B10	Одиночный вариабельный домен 1A10-V1	Одиночный вариабельный домен 1A10-V2	Одиночный вариабельный домен 1A11-V1	Одиночный вариабельный домен 1A11-V2
Третий антигенсвязывающий фрагмент	Одиночные вариабельные домены 1A1 + 1A1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10	Одиночные вариабельные домены 1A11 + 1A11	Одиночные вариабельные домены 1B10 + 1B10	Одиночные вариабельные домены 1A10-V1 + 1A10-V1	Одиночные вариабельные домены 1A10-V2 + 1A10-V2	Одиночные вариабельные домены 1A11-V1 + 1A11-V1	Одиночные вариабельные домены 1A11-V2 + 1A11-V2
Одиночный вариабельный домен 1A1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1B10	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10-V1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10-V2	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11-V1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11-V2
Одиночный вариабельный домен 1A10	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1B10	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10-V1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A10-V2	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11-V1	Одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A11-V2



	1A10- V2 + 1A1	1A10- V2 + 1A10	1A10- V2 + 1A11	1A10- V2 + 1B10	1A10- V2 + 1A10- V1	1A10- V2 + 1A10- V2	1A10- V2 + 1A11- V1	1A10- V2 + 1A11- V2
Одиночный вариабельный домен 1A11- V1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A10	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A11	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1B10	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A10- V1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A10- V2	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A11- V1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V1 + 1A11- V2
Одиночный вариабельный домен 1A11- V2	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A10	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A11	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1B10	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A10- V1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A10- V2	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A11- V1	Одино чные вариаб ельные домен ы 1A11- V2 + 1A11- V2

Примечание: в таблице (X) + (Y) указывает на комбинацию третьего антигенсвязывающего фрагмента и первого антигенсвязывающего фрагмента мультиспецифического антитела. Например, «одиночные вариабельные домены 1A10 + 1A1» указывает на то, что третий антигенсвязывающий фрагмент мультиспецифического антитела представляет собой аминокислотную последовательность одиночного вариабельного домена 1A10, в то время как первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой аминокислотную последовательность одиночного вариабельного домена 1A1; аминокислотные последовательности одиночных вариабельных доменов, указанные в таблице, показаны в таблице S2.

В настоящем изобретении первый антигенсвязывающий фрагмент может быть

получен от животных семейства Camelidae или быть гуманизированным. Третий антигенсвязывающий фрагмент может быть получен от животных семейства Camelidae или быть гуманизированным. Гуманизация может снижать иммуногенность, и в некоторых вариантах осуществления как первый антигенсвязывающий фрагмент, так и третий антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления как первый антигенсвязывающий фрагмент, так и третий антигенсвязывающий фрагмент получены от животных семейства Camelidae.

В мультиспецифическом антителе, описанном в настоящем документе, второй антигенсвязывающий фрагмент обеспечивает способность нацеливаться на активирующий Т-клеточный антиген. Второй антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой Fab, ScFv или ScFab. В одном варианте осуществления активирующий Т-клеточный антиген представляет собой CD3. В конкретном варианте осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, который связывается с CD3. В другом конкретном варианте осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, который связывается с CD3.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент является мышинным, химерным или гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит следующие определяющие комплементарности области: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; переменная область легкой цепи содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

В конкретном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 49, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, HCDR2 и LCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, и содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50. В конкретном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50. В более конкретном варианте осуществления переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента представлены в SEQ ID NO: 49 и 50, соответственно.

Таблица S5. Последовательности CDR и переменной области примерного второго антигенсвязывающего фрагмента

Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD3-HCDR1	TYAMN	43
CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	44
CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	45
CD3-LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	46
CD3-LCDR2	GTNKRAP	47
CD3-LCDR3	ALWYSNLWV	48
CD3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA MYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVS S	49
CD3-VL	ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFS GSLGGKAALTITGVQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVL	50

Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, может не иметь Fc-домена, и первый антигенсвязывающий фрагмент, второй антигенсвязывающий

фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент соединены подходящими линкерами.

Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, может иметь Fc-домен, и Fc-домен может продлевать период полувыведения, обеспечивать эффектор, связанный с доменом Fc, и т. п.

#### Конфигурации мультиспецифических антител

Компоненты мультиспецифического антитела, описанного в настоящем документе, могут быть слиты друг с другом в различных конфигурациях. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело дополнительно содержит (iv) Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов.

Третий антигенсвязывающий фрагмент может быть слит с первым антигенсвязывающим фрагментом или вторым антигенсвязывающим фрагментом. В альтернативном варианте осуществления (1) третий антигенсвязывающий фрагмент и первый антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер. В альтернативном варианте осуществления (2) третий антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер.

В альтернативном варианте осуществления (1) третий антигенсвязывающий фрагмент и первый антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер. В более конкретном варианте осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, и второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена. В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий

фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Такие конфигурации схематически изображены на фиг. 5А. Для варианта осуществления в дополнительных более конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело имеет три полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, вторая полипептидная цепь содержит Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и третья полипептидная цепь представляет собой Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше.

В другом конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные переменные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента. Такие конфигурации схематически изображены на фиг. 5А. Для варианта осуществления, в дополнительных более конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело имеет две полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и вторая полипептидная цепь содержит второй антигенсвязывающий фрагмент и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше.

Для способа соединения третьего антигенсвязывающего фрагмента в альтернативном варианте осуществления (2) третий антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер. В более конкретных вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, и второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена. В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида



Fc-домена. При этом третий антигенсвязывающий фрагмент слит с N-концом Fab легкой цепи или Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные вариабельные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем C-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем C-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем C-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента. Такие конфигурации схематически изображены на фиг. 5C. Для варианта осуществления, более конкретно, мультиспецифическое антитело имеет две полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанный выше, и вторая полипептидная цепь содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, третий антигенсвязывающий фрагмент и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанный выше.

В другом конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба представляют собой одиночные вариабельные домены, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем C-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на C-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем C-конце слит с N-концом Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента (такие конфигурации схематически изображены на фиг. 5D) или N-концом Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента. Для варианта осуществления, дополнительно более конкретно, мультиспецифическое антитело имеет три полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, вторая полипептидная цепь содержит Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и третья полипептидная цепь содержит третий антигенсвязывающий фрагмент и Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше. Необязательно мультиспецифическое антитело имеет три полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и один Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, вторая полипептидная цепь содержит Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, третьего антигенсвязывающего

фрагмента и другой Fc-полипептид Fc-домена, описанного выше, и третья полипептидная цепь содержит Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента, описанного выше.

Когда второй антигенсвязывающий фрагмент, описанный выше, представляет собой ScFv, переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL), включенные во второй антигенсвязывающий фрагмент, расположены в любом порядке. Например, в одном варианте осуществления VH и VL второго антигенсвязывающего фрагмента расположены в порядке VL-VH от N-конца к C-концу; в другом варианте осуществления VH и VL второго антигенсвязывающего фрагмента расположены в порядке VH-VL от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления VH и VL второго антигенсвязывающего фрагмента слиты с помощью пептидного линкера с образованием ScFv.

В любом из вариантов осуществления, описанных выше, компоненты мультиспецифического антитела функционально связаны, например, слиты непосредственно или через различные пептидные линкеры (например, пептидные линкеры, содержащие одну или более аминокислот, обычно около 1-50 аминокислот), как описано в настоящем документе или известно в данной области техники, и шарниры, которые могут быть разумно выбраны специалистами в данной области техники.

Третий антигенсвязывающий фрагмент может быть слит с первым антигенсвязывающим фрагментом или вторым антигенсвязывающим фрагментом либо напрямую, либо через пептидный линкер. В одном варианте осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент слит с первым антигенсвязывающим фрагментом или вторым антигенсвязывающим фрагментом посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления, когда второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой структуру ScFv, его переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи соединены через пептидный линкер.

Каждый пептидный линкер может независимо представлять собой любой подходящий, например, электрически заряженный и/или гибкий линкерный полипептид. В конкретном варианте осуществления пептидный линкер состоит из от 1 до 50 аминокислот, связанных пептидными связями, причем аминокислоты могут быть выбраны из группы, состоящей из 20 встречающихся в природе аминокислот; в более предпочтительном варианте осуществления от 1 до 50 аминокислот выбраны из группы, состоящей из глицина, аланина, пролина, серина, аспарагина, глутамина и лизина. Таким образом, примерные пептидные линкеры могут представлять собой полиглицины (в частности, (Gly)<sub>4</sub> и (Gly)<sub>5</sub>), поли(Gly-Ser), (Gly)<sub>3</sub>AsnGlySer(Gly)<sub>2</sub>, (Gly)<sub>3</sub>Cys(Gly)<sub>4</sub>,

GlyProAsnGlyGly или те, которые раскрыты в таблице 4 патентной заявки WO2019195535 и т. д.

В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может быть пептидным линкером, состоящим из глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий GGGGS в качестве единицы, пептидный линкер, содержащий GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 2), или пептидный линкер, содержащий GGGPGKR. Предпочтительно, пептидный линкер, содержащий GGGGS в качестве единицы, представляет собой (GGGGS) $n$ , где  $n$  представляет собой любое число от 1 до 10, то есть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, или любой диапазон, определенный любыми двумя из вышеупомянутых чисел, например, 1-5, 2-5, 3-6, 2-4 и 1-4. В некоторых конкретных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкерный полипептид, содержащий GGGGS, (GGGGS) $2$ , (GGGGS) $3$  или (GGGGS) $4$ . В некоторых конкретных вариантах осуществления третий антигенсвязывающий фрагмент слит с первым антигенсвязывающим фрагментом или вторым антигенсвязывающим фрагментом через пептидный линкер GGGGS (SEQ ID NO: 1) или (GGGGS) $2$  или (GGGGS) $3$ . В некоторых вариантах осуществления, когда второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой структуру ScFv, его переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи соединены через пептидный линкер GGGGS или (GGGGS) $2$  или (GGGGS) $3$ .

Когда антигенсвязывающий фрагмент слит с Fc, он обычно слит через шарнирную область. В одном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент слит с одним Fc-полипептидом Fc-домена через первый шарнир, и второй антигенсвязывающий фрагмент слит с одним Fc-полипептидом Fc-домена через второй шарнир. В некоторых вариантах осуществления первый шарнир и второй шарнир могут образовывать ковалентную связь, такую как дисульфидная связь. Первый шарнир или/и второй шарнир могут содержать аминокислоты шарнирной области IgG человека, и шарнирная область IgG человека содержит нативную шарнирную область или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления первый шарнир или/и второй шарнир содержит/содержат аминокислоты шарнирной области IgG1 человека; в некоторых вариантах осуществления первый шарнир или/и второй шарнир содержит/содержат аминокислоты шарнирной области IgG4 человека. В некоторых конкретных вариантах осуществления первый шарнир содержит GERKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 3), и второй шарнир содержит EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4); в других конкретных вариантах осуществления

первый шарнир содержит EPKSCDKTHTCPPCP, и второй шарнир содержит GEPKSSDKTHTCPPCP. В некоторых конкретных вариантах осуществления как первый шарнир, так и второй шарнир содержат GEPKSSDKTHTCPPCP или EPKSCDKTHTCPPCP.

#### Fc-домен

Fc-домен мультиспецифического антитела состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домен тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, и каждый из Fc-полипептидов содержит CH2 и CH3 константных областей тяжелой цепи IgG. Два Fc-полипептида Fc-домена способны стабильно связываться друг с другом. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело, описанное в данном документе, содержит один Fc-домен.

В одном варианте осуществления Fc-домен мультиспецифического антитела представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В другом варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4. В более конкретном варианте осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG4, содержащий аминокислотную замену в положении S228, в частности аминокислотную замену S228P, которая уменьшает *in vivo* обмен Fab плеча на антитело IgG4. В еще одном конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен человека. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, такую как аминокислотная замена. Модификация может представлять собой, например, модификацию, которая способствует гетеродимеризации, модификацию, которая изменяет эффекторную функцию, модификацию, которая изменяет способность связывания с белком A, или т. п.

В некоторых вариантах осуществления Fc содержит модификацию, которая способствует гетеродимеризации.

Мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, содержит различные антигенсвязывающие фрагменты, слитые с одним или другим из двух Fc-полипептидов в Fc-домене, таким образом, два Fc-полипептида, как правило, содержатся в двух разных полипептидных цепях. Несколько возможных комбинаций двух полипептидов получали путем рекомбинантной соэкспрессии и последующей димеризации этих полипептидов. Для увеличения выхода и чистоты мультиспецифического антитела при рекомбинантной продукции было бы

предпочтительно ввести модификацию, которая способствует связыванию желаемых полипептидов с Fc-доменом мультиспецифического антитела. Таким образом, в конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая способствует ассоциации двух Fc-полипептидов Fc-домена.

Сайт для наиболее обширного белок-белкового взаимодействия между двумя Fc-полипептидами Fc-домена IgG человека находится в домене СН3 Fc-домена. Таким образом, в одном варианте осуществления модификация находится в домене СН3 Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления модификация представляет собой так называемую модификацию "выступ-впадину", которая содержит модификацию "выступа" в одном из двух Fc-полипептидов Fc-домена и модификацию "впадины" в другом одном из двух Fc-полипептидов Fc-домена. Как правило, способ включает введение выпуклости («выступа») на границе раздела одного Fc-полипептида и соответствующей полости («впадины») на границе раздела другого Fc-полипептида, так что выпуклость может быть расположена в полости, чтобы способствовать образованию гетеродимера и мешать образованию гомодимера. Выступ сконструирован путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты с поверхности раздела одного Fc-полипептида более крупной боковой цепью (например, тирозином или триптофаном и т. д.). Комплементарную полость, имеющую тот же или аналогичный размер, что и выпуклость, создавали на поверхности раздела другого Fc-полипептида путем замены большой боковой цепи аминокислоты меньшей боковой цепью аминокислоты (например, аланином или треонином и т. д.).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи в домене СН3 одного Fc-полипептида мультиспецифического антитела, тем самым создавая выпуклость в домене СН3 Fc-полипептида, которая может быть расположена в полости в домене СН3 другого Fc-полипептида, и аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи в домене СН3 другого Fc-полипептида, тем самым создавая полость в домене СН3 Fc-полипептида.

В некоторых конкретных вариантах осуществления один Fc-полипептид Fc-домена содержит T366Y/W или/и S354C, и другой Fc-полипептид содержит Y407T/V, Y349C, T366S или/и L368A. В более конкретном варианте осуществления один Fc-полипептид Fc-домена содержит аминокислотные замены T366Y/W и S354C, и другой Fc-полипептид содержит аминокислотные замены Y407T/V, Y349C, T366S и L368A. В более конкретном варианте осуществления Fc может быть Fc IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, которая

изменяет эффекторную функцию. В некоторых конкретных вариантах осуществления Fc-домен мультиспецифического антитела модифицировали для снижения аффинности связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией Fc-домена по сравнению с Fc, не подвергнутым модификации. Снижение аффинности связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией Fc-домена является полезным для улучшения высвобождения цитокинов и уменьшения побочных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или снижает эффекторную функцию Fc-домена, представляет собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в одном или более положений, выбранных из E233, L234, L235, N297, P331 и P329. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в одном или более положений, выбранных из L234, L235 и P329. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A. В одном из таких вариантов осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, в частности, Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления аминокислотная замена представляет собой P329A, P329R или P329G. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329 и другую аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте осуществления другая аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D и P331S. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену в положениях P329, L234 и L235. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G ("P329G LALA"). В другом более конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329A ("P329A LALA"). В одном из таких вариантов осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, в частности, Fc IgG1 человека.

В некоторых конкретных вариантах осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и P329A/G/R.

Аминокислотная замена, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с рецептором Fc и/или эффекторной функцией Fc-домена, описанного выше, происходит на двух полипептидных цепях Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, которая уменьшает или устраняет связывание области CH3 одного Fc-полипептида в Fc-домене с

белком А (от *Staphylococcus aureus*). В некоторых вариантах осуществления указанная модификация представляет собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R или/и Y436F, которая встречается только в одном Fc-полипептиде, и не в другом Fc-полипептиде. В конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R или/и Y436F, которая встречается только в одном Fc-полипептиде. В одном из таких вариантов осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, в частности, Fc IgG1 человека.

В мультиспецифическом антителе, описанном в настоящем документе, Fc-домен может содержать одну, две или три модификации, которые способствуют гетеродимеризации, модификацию, которая изменяет эффекторную функцию, и модификацию, которая уменьшает или устраняет связывание области СНЗ одного Fc-полипептида в Fc с белком А. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит модификацию, которая способствует ассоциации двух Fc-полипептидов, модификацию, которая уменьшает аффинность связывания Fc-домена с рецептором Fc и/или снижает эффекторную функцию Fc-домена, и модификацию, которая уменьшает или устраняет связывание области СНЗ одного Fc-полипептида в Fc с белком А. Конкретные варианты осуществления различных типов модификаций, описанных выше, могут быть объединены. Например, в конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит следующие группы аминокислотных замен:

- i. Y407T/V, Y349C, T366S, L368A, T366Y/W и S354C, где аминокислотные замены T366Y/W и S354C находятся на одном и том же Fc-полипептиде и не находятся на одном и том же Fc-полипептиде с другими аминокислотными заменами в (i.);
- ii. L234A, L235A и P329A; и
- iii. H435R и Y436F, которые встречаются только в одном полипептиде Fc.

В более конкретном варианте осуществления, согласно нумерации EU, один Fc-полипептид Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A, P329A, Y349C, T366S, L368A и Y407V, и другой Fc-полипептид содержит аминокислотные замены L234A, L235A, P329A, S354C, T366W, H435R и Y436F. В одном из таких вариантов осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, в частности, Fc IgG1 человека.

В контексте настоящего изобретения аминокислотные замены представлены как: исходная аминокислота, замещенная в положении аминокислоты, с использованием трехбуквенных (Хаа) или однобуквенных (X) кодов для представления аминокислотных остатков. Таким образом, например, "H435R" означает, что аминокислота H в положении 435 замещена аминокислотой R, и может иметь более 1 замещенной аминокислоты, например, T366Y/W означает, что аминокислота T в положении 366 замещена

аминокислотой Y или W.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело, описанное в данном документе, является трехвалентным, то есть, каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента, второго антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента обеспечивает одновалентное связывание с соответствующим антигеном.

Настоящее изобретение относится к типичному трехвалентному мультиспецифическому антителу.

В одном примере мультиспецифическое антитело состоит из двух полипептидных цепей, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 67, соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие две полипептидные цепи, представлены в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 68, соответственно.

В одном примере мультиспецифическое антитело состоит из двух полипептидных цепей, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 71, соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие две полипептидные цепи, представлены в SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 72, соответственно.

В одном примере мультиспецифическое антитело состоит из трех полипептидных цепей, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 63, соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие две полипептидные цепи, представлены в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64, соответственно.

В одном примере мультиспецифическое антитело состоит из трех полипептидных цепей, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 75, соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие две полипептидные цепи, представлены в SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 76, соответственно.

#### Композиция

Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую мультиспецифическое антитело и дополнительно содержащую один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, эксципиенты, разбавители, инкапсулирующие материалы, наполнители, буферы или другие агенты.

#### Выделенная нуклеиновая кислота



Настоящее изобретение предлагает выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе. Последовательности нуклеиновых кислот некоторых мультиспецифических антител иллюстративно перечислены в списке последовательностей.

#### Вектор

Настоящее изобретение предлагает вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор клонирования; в других вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии; в конкретном варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой pcDNA3.1(+). Вектор экспрессии необязательно представляет собой любой вектор экспрессии, способный экспрессировать мультиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе.

#### Клетка-хозяин

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащей вектор, описанный в настоящем документе, причем клетка-хозяин представляет собой подходящую клетку-хозяина для применения при клонировании или экспрессии мультиспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин выбрана из дрожжевой клетки, клетки млекопитающего или других клеток, подходящих для получения мультиспецифического антитела. Клетки млекопитающих представляют собой, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки CHO-S.

#### Способ получения мультиспецифического антитела

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ получения мультиспецифического антитела, включающий культивирование клетки-хозяина для экспрессии мультиспецифического антитела и выделение и очистку мультиспецифического антитела в системе. Для получения мультиспецифического антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическое антитело, выделяли и встраивали в один или более векторов для дальнейшего применения при клонировании и/или экспрессии в клетке-хозяине. Нуклеиновая кислота может быть получена с использованием различных способов, известных в данной области техники, таких как сплайсинг генов и химический синтез.

#### Применение

Настоящее изобретение предлагает применение мультиспецифического антитела. В некоторых конкретных вариантах осуществления используемое мультиспецифическое антитело может представлять собой ВС24, РС1, РС2 и/или РС3.

Настоящее изобретение предлагает применение мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА.

Настоящее изобретение предлагает способ лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой опухоль или аутоиммунное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой лимфому, множественную миелому, лейкоз, системную красную волчанку или ревматоидный артрит.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает примерные варианты осуществления:

Вариант осуществления 1. Мультиспецифическое антитело, содержащее

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

(ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антигеном; и

(iii) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

где первый антиген представляет собой ВСМА и второй антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген, и первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба являются одиночными вариабельными доменами и каждый независимо содержит любую из:

(a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; или

(d) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 2. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 1, где каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит любую из:

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 3. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 2, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и третий антигенсвязывающий фрагмент, содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 4. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 2, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3,

содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и первый антигенсвязывающий фрагмент, содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

Вариант осуществления 5. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 1, где каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 одиночного варибельного домена, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39 или 40; предпочтительно каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит CDR1, CDR2 и CDR3 одиночного варибельного домена, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 или 39.

Вариант осуществления 6. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-5, где первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент независимо содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, 41, 42 или 25.

Вариант осуществления 7. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-6, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41.

Вариант осуществления 8. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 7, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, 37 или 38; предпочтительно первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37.

Вариант осуществления 9. Мультиспецифическое антитело по любому из

вариантов осуществления 1-8, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42.

Вариант осуществления 10. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 9, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, 39 или 40; предпочтительно третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39.

Вариант осуществления 11. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-6, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42.

Вариант осуществления 12. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 11, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, 39 или 40; предпочтительно первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39.

Вариант осуществления 13. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-12, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41.

Вариант осуществления 14. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 13, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, 37 или 38; предпочтительно третий антигенсвязывающий фрагмент содержит

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37.

Вариант осуществления 15. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-5, где первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из:

(1) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(2) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 и третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(3) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(4) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(5) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(6) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(7) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

(8) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

(9) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; или

(10) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

Вариант осуществления 16. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-15, где одиночный вариабельный домен получен от животных семейства Camelidae или является гуманизированным.

Вариант осуществления 17. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-16, где первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент являются идентичными.

Вариант осуществления 18. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-16, где первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент являются различными.

Вариант осуществления 19. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-18, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, ScFv или ScFab.

Вариант осуществления 20. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-19, где активирующий Т-клеточный антиген представляет собой CD3.

Вариант осуществления 21. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие определяющие комплементарность области: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Вариант осуществления 22. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 49; и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, HCDR2 и LCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 50.

Вариант осуществления 23. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-22, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50; предпочтительно переменная область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и ее переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50.

Вариант осуществления 24. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-23, где второй антигенсвязывающий фрагмент является мышиным, химерным или гуманизированным.

Вариант осуществления 25. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-24, где третий антигенсвязывающий фрагмент и первый антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер.

Вариант осуществления 26. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 25, где третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 27. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-24, где третий антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер.



Вариант осуществления 28. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 27, где третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 29. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-28, дополнительно содержащее

(iv) Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов.

Вариант осуществления 30. Мультиспецифическое антитело согласно варианту осуществления 29, где первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, и второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена.

Вариант осуществления 31. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 30, где структура от N-конца до С-конца второго связывающего фрагмента представляет собой VL-VH или VH-VL.

Вариант осуществления 32. Мультиспецифическое антитело согласно варианту осуществления 29, где первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена.

Вариант осуществления 33. Мультиспецифическое антитело согласно варианту осуществления 32, где третий антигенсвязывающий фрагмент слит с N-концом Fab легкой цепи или Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 34. Мультиспецифическое антитело согласно варианту осуществления 29, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 35. Мультиспецифическое антитело согласно варианту осуществления 29, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 36. Мультиспецифическое антитело согласно

варианту осуществления 29, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 37. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 29, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента или N-концом Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 38. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-37, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG.

Вариант осуществления 39. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 38, где Fc-домен IgG представляет собой Fc-домен IgG человека, предпочтительно Fc-домен IgG1 человека или IgG4 человека.

Вариант осуществления 40. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-39, где Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая способствует ассоциации двух Fc-полипептидов Fc-домена.

Вариант осуществления 41. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-40, где согласно нумерации EU один Fc-полипептид Fc-домена содержит аминокислотные замены T366Y/W и S354C, и другой Fc-полипептид содержит аминокислотные замены Y407T/V, Y349C, T366S и L368A.

Вариант осуществления 42. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-41, где Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию Fc-домена.

Вариант осуществления 43. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 42, где в соответствии с нумерацией EU аминокислотная замена, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с рецептором Fc и/или эффекторной функцией Fc-домена, находится в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из L234, L235 и P329; предпочтительно, оба Fc-полипептида Fc-домена

содержат аминокислотные замены L234A, L235A и P329G или содержат аминокислотные замены L234A, L235A и P329A.

Вариант осуществления 44. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-41, где Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая уменьшает или устраняет связывание области СНЗ одного Fc-полипептида в Fc-домене с белком А.

Вариант осуществления 45. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 44, где в соответствии с нумерацией EU Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R или/и Y436F, которая встречается только в одном Fc-полипептиде.

Вариант осуществления 46. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 29-39, где согласно нумерации EU один Fc-полипептид Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A, P329A, Y349C, T366S, L368A и Y407V, и другой Fc-полипептид содержит аминокислотные замены L234A, L235A, P329A, S354C, T366W, H435R и Y436F.

Вариант осуществления 47. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-46, где мультиспецифическое антитело является трехвалентным.

Вариант осуществления 48. Мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-46, где мультиспецифическое антитело состоит из:

(1) двух полипептидных цепей, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67;

(2) две полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 71;

(3) три полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь содержит

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 63;

(4) три полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 73, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75.

Вариант осуществления 49. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления 1, где мультиспецифическое антитело состоит из:

(1) двух полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67;

(2) двух полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71;

(3) трех полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63; или

(4) трех полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

Вариант осуществления 50. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, кодирующий мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-49.

Вариант осуществления 51. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 50.

Вариант осуществления 52. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 50 или вектор по варианту осуществления 51.

Вариант осуществления 53. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-49, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 52 для экспрессии мультиспецифического антитела и выделение и очистку мультиспецифического антитела в системе.

Вариант осуществления 54. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 1-49 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 55. Способ лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-49 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 54.

Вариант осуществления 56. Способ по варианту осуществления 55, где заболевание представляет собой лимфому, множественную миелому, лейкоз, системную красную волчанку или ревматоидный артрит.

Вариант осуществления 57. ВСМА-связывающее антитело, содержащее одиночный вариабельный домен, где одиночный вариабельный домен содержит:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 58. ВСМА-связывающее антитело по варианту осуществления 57, где одиночный вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в 19, 21, 23, 25, 37, 38, 39, 40, 41 или 42.

Вариант осуществления 59. ВСМА-связывающее антитело по варианту осуществления 58, где одиночный вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40.

Вариант осуществления 60. ВСМА-связывающее антитело по любому из вариантов осуществления 57-59, где одиночный вариабельный домен получен от животных семейства Camelidae или является гуманизированным.

Вариант осуществления 61. ВСМА-связывающее антитело по любому из вариантов осуществления 57-60, где антитело содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 51, 53, 55 или 57.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1. Конструирование библиотеки фагового дисплея однодоменного антитела к ВСМА

Рекомбинантный слитый белок ВСМА-Fc человека (ACRO, № продукта в каталоге BC7-H5254) смешивали и эмульгировали с полным адьювантом Фрейнда в объемном соотношении 1:1. Двугорбого верблюда сначала иммунизировали подкожной многоточечной инъекцией, и затем иммунизировали рекомбинантным слитым белком ВСМА-Fc человека, смешанным и эмульгированным с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении по объему 1:1 в качестве бустера с интервалом в 2 недели. Сыворотку собирали после четвертой или пятой иммунизации и анализировали на титр антител к ВСМА человека. После нескольких раундов иммунизации собирали периферическую кровь двугорбого верблюда и выделяли мононуклеарные клетки периферической крови

(РВМС). После экстракции РНК РВМС обратно транскрибировали в кДНК (комплементарная ДНК) и амплифицировали V<sub>H</sub>H-кодирующий фрагмент антитела верблюда.

Кодирующий V<sub>H</sub>H фрагмент, полученный в результате амплификации, расщепляли эндонуклеазой PstI/NotI и вставляли в фагмидный вектор pMECS (NTCC Plasmid Vector, Strain, Cell and Gene Collection, № продукта в каталоге pMECS) для конструирования рекомбинантного вектора, который затем электрически переносили в *Escherichia coli* TG1 (Lucigen, № продукта в каталоге 60502-1) для конструирования библиотечного фонда. Библиотечный фонд V<sub>H</sub>H амплифицировали до логарифмической фазы роста. Библиотечную амплификацию проводили путем добавления хелперных фагов M13KO7 (New England Biolabs, № продукта в каталоге N0315S), при встряхивании в течение ночи при 200 об/мин при 28 °С. Бактериальную жидкость центрифугировали и собирали супернатант. Добавляли 1/4 объема супернатанта раствора PEG6000/NaCl (PEG6000 - полиэтилен 6000) (20% PEG6000 (мас./об.), 2,5 М NaCl). Смесь инкубировали на льду в течение 1-2 ч для осаждения фагов и центрифугировали. Осажденные фаги собирали и ресуспендировали в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), и затем добавляли 20% глицерина. Суспензию сохраняли при -80 °С в виде однодоменной библиотеки фагового дисплея антител.

#### Пример 2 Скрининг однодоменных антител к ВСМА человека

Библиотеку фагового дисплея однодоменного антитела подвергали твердофазному пэннингу. Одиночные клоны, полученные в результате пэннинга, культивировали. Экспрессию индуцировали изопропил-β-D-тиогалактозидом (IPTG) и собирали супернатант.

Отобранные клоны подвергали положительной идентификации с помощью непрямого ELISA для ВСМА-His человека (ACRO, № продукта в каталоге BCA-H522y). Положительные клоны, которые связываются только с ВСМА-His человека с относительно высокими значениями сигнала, отбирали для сохранения и секвенировали. Положительные клоны 1A1, 1A10, 1A11 и 1B10 были получены в результате скрининга. Анализ последовательности показывает, что 1A1 имеет нуклеотидную последовательность V<sub>H</sub>H SEQ ID NO: 20 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; 1A10 имеет нуклеотидную последовательность V<sub>H</sub>H SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; 1A11 имеет нуклеотидную последовательность V<sub>H</sub>H SEQ ID NO: 24 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; 1B10 имеет нуклеотидную последовательность V<sub>H</sub>H SEQ ID NO: 26 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

### Пример 3. Получение химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека

#### 3.1 Получение химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc

Последовательности V<sub>H</sub>H положительных клонов, полученных в результате скрининга, связывали с Fc-областью человека для конструирования химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc. В частности, последовательности V<sub>H</sub>H или последовательность контрольного антитела V<sub>H</sub>H к ВСМА человека (BM) (аминокислотная последовательность была такой же, как SEQ ID NO: 125 в CN109153731A) встраивали в эукариотический вектор экспрессии pCDNA3.1, содержащий константную область IgG1 человека (аминокислотная последовательность была SEQ ID NO: 5). Данные химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc(BM-Fc в качестве контроля) экспрессировали с использованием системы экспрессии транзientной трансфекции Expiectamine<sup>TM</sup> CHO Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., № продукта в каталоге A29129). После очистки антител через аффинную колонку с белком А связывание антител с белками человека TACI и BAFF-R обнаруживали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (см. 3.2 для способа). Обнаружение показывает, что 1A1-Fc, 1A10-Fc, 1A11-Fc и 1B10-Fc способны специфически связываться с белком ВСМА-His, но не связываются с белками человека TACI и BAFF-R. Анализ последовательности показывает, что аминокислотная последовательность полноразмерного 1A1-Fc представлена в SEQ ID NO: 27, и его нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 28; аминокислотная последовательность полноразмерного 1A10-Fc представлена в SEQ ID NO: 29, и его нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 30; аминокислотная последовательность полноразмерного 1A11-Fc представлена в SEQ ID NO: 31, и его нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 32; аминокислотная последовательность полноразмерного 1B10-Fc представлена в SEQ ID NO: 33, и его нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 34.

#### 3.2 Обнаружение связывания антител с белками человека TACI и BAFF-R методом поверхностного плазмонного резонанса

Химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека тестировали на специфичность с использованием системы анализа биомолекулярного взаимодействия (GE, Biacore T200). Антитело к IgG (Fc) (GE, № продукта в каталоге BR-1008-39) была аминосвязана с чипом датчика CM5. Химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека разбавляли до 2 мкг/мл подвижным буфером (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% поверхностно-активного вещества P-20 (масс./об.), pH 7,4) и захватывание проводили в течение 90 с пропуском раствора через экспериментальные каналы со скоростью потока 30 мкл/мин. Белок человека TACI или BAFF-R разбавляли до 100 нМ с



помощью подвижного буфера и связывание проводили пропусканием раствора со скоростью потока 50 мкл/мин. Наблюдали кривую сигнала связывания. Кривую связывания не наблюдали для 1A1-Fc, 1A10-Fc, 1A11-Fc и 1B10-Fc, и они не связываются с белками TACI и BAFF-R.

Пример 4 Аффинность химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc против ВСМА человека к ВСМА человека и ВСМА яванского макака

4.1 Определение аффинности антител к ВСМА человека и ВСМА яванского макака с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека тестировали на аффинность с использованием системы анализа биомолекулярного взаимодействия (GE, Biacore T200). Обнаружение показывает, что 1A1-Fc, 1A10-Fc, 1A11-Fc и 1B10-Fc имеют относительно высокую аффинность к белку ВСМА человека, при этом существуют перекрестные реакции 1A10-Fc и 1A11-Fc с белком ВСМА яванского макака, и 1A1-Fc, 1B10-Fc и VM-Fc не связываются с белком ВСМА яванского макака.

4.2 Обнаружение связывания антител с клетками методом проточной цитометрии

Связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека с клетками-мишенями с различными уровнями экспрессии ВСМА обнаруживали с помощью проточной цитометрии. Клетки CHO-hBCMA (iCarTab Biotechnology (Suzhou) Co. Ltd., № продукта в каталоге AKD001A) представляли собой стабильно трансфицированную клеточную линию, с высокой экспрессией ВСМА. Клетки U266 (Центр культуры клеток, Институт фундаментальных медицинских наук, Китайская академия медицинских наук, № продукта в каталоге 3111C0001CCC000684) представляли собой естественную клеточную линию миеломы человека, экспрессирующую ВСМА на средних уровнях. Клетки PRMI8226 (Центр культуры клеток, Институт фундаментальных медицинских наук, Китайская академия медицинских наук, каталог продукции № 3111C0001CCC000083) представляли собой естественную клеточную линию миеломы человека, экспрессирующую ВСМА на низких уровнях. Клетки HUVEC (ScienCell Research Laboratories, № продукта в каталоге AKD001A 8000) представляли собой линию эндотелиальных клеток пупочной вены человека, не экспрессирующую ВСМА. После того, как  $2 \times 10^5$  клеток-мишеней инкубировали с серийно разбавленными химерными антителами V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека (серийно разбавленными в 5 раз от начальной концентрации 126 нМ до 6 концентраций) на льду в течение 1 часа, клетки промывали. Добавляли меченное PE (фикоэритрин) антитело к Fc IgG человека (Jackson Immuno Research, № продукта в каталоге 109-116-170) и инкубировали смесь на льду в течение 0,5 ч. Клетки промывали, и затем тестировали с помощью проточного цитометра (Thermo Fisher Scientific Inc., Attune

NXT).

Как показано на фиг. 1A-1C и в таблице 1, 1A1-Fc, 1A10-Fc, 1A11-Fc и 1B10-Fc могут эффективно связываться с клетками CHO-hBCMA, которые экспрессируют BCMA на относительно высоких уровнях, и клетками U266, которые экспрессируют BCMA на средних уровнях; они также значительно связываются с клетками RPMI8226, которые экспрессируют BCMA на относительно низких уровнях; 1A10-Fc и 1A11-Fc связываются с клетками U266 лучше, чем BM-Fc. Как показано на фиг. 1D, 1A10-Fc и 1A11-Fc не связывались с клетками HUVEC, которые не экспрессировали BCMA, но 1A1-Fc и 1B10-Fc связывались с клетками HUVEC, которые не экспрессировали BCMA.

Таблица 1 Аффинность химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к BCMA человека к клеткам-мишеням

Химерное антитело	Клетки CHO-hBCMA	Клетки U266
V <sub>H</sub> H-Fc	EC50 (нМ)	EC50 (нМ)
1A1-Fc	3,04	2,77
1A10-Fc	4,28	4,64
1A11-Fc	2,08	1,26
1B10-Fc	2,51	1,72
BM-Fc	4,06	6,02

4.3 Обнаружение связывания антител с клетками HEK293T, временно трансфицированными BCMA яванского макака, с помощью проточной цитометрии

Полноразмерный (SEQ ID NO: 6) ген BCMA яванского макака синтезировали *in vitro* и вставляли в эукариотический вектор экспрессии pCDNA3.1. Клетки HEK293T трансфицировали вектором экспрессии с использованием Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., № продукта в каталоге L3000015) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, клетки HEK293T высевали в 6-луночный планшет в количестве 5 × 10<sup>5</sup>/лунку. Примерно через 24 часа фетальную среду, содержащую бычью сыворотку, удаляли с помощью пипетки и клетки промывали PBS. Затем в каждую лунку добавляли реагент для трансфекции в соотношении ДНК к Lipo3000 5 мкг:7,5 мкл. Примерно через 6 ч реагент для трансфекции заменяли 10% фетальной бычьей сывороткой (об./об.). После трансфекции в течение около 24 часов клетки собирали для обнаружения с помощью проточной цитометрии.

Антитела 1A10-Fc, 1A11-Fc и BM-Fc серийно разбавляли (серийно разбавляли в 5 раз от начальной концентрации 126 нМ до 5 концентраций, и разбавленный раствор

образца использовали в качестве групп отрицательного контроля), и каждый из них использовали для инкубации  $2 \times 10^5$  клеток НЕК293Т, транзientно трансфицированных ВСМА яванского макака и не трансфицированных. После инкубации на льду в течение 1 часа клетки промывали и добавляли меченное PE антитело к Fc IgG человека (Jackson Immuno Research, № продукта в каталоге 109-116-170). Смеси инкубировали на льду в течение 0,5 ч. Клетки промывали, и затем тестировали с помощью проточного цитометра (Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NXT). На фиг. 2А были приняты клетки НЕК293Т, транзientно трансфицированные ВСМА яванского макака (НЕК293Т-СупоВСМА). На фиг. 2В были приняты клетки НЕК293Т, не трансфицированные ВСМА яванского макака. Значения  $EC_{50}$  и максимальные значения связывания MFI (средняя интенсивность флуоресценции) (Вмакс) связывания химерных антител Fc с клетками НЕК293Т, временно трансфицированными ВСМА яванского макака, показаны в таблице 2. Результаты показывают, что 1А10-Fc и 1А11-Fc связывались с ВСМА яванского макака из клеток, и что антитело ВМ-Fc не связывалось с ВСМА яванского макака.

Таблица 2. Связывание химерных антител  $V_H$ Н-Fc к ВСМА человека с клетками НЕК293Т, временно трансфицированными ВСМА яванского макака

Химерное антитело $V_H$ Н-Fc	$EC_{50}$ (нМ)	Вмакс (MFI)
1А10-Fc	2,02	2475,0
1А11-Fc	10,36	501,8
ВМ-Fc	/	217,0
Отрицательный контроль	/	157,0

Пример 5. Химерные антитела  $V_H$ Н-Fc к ВСМА человека блокируют связывание APRIL с ВСМА

После серийно разбавленных химерных антител  $V_H$ Н-Fc 1А10-Fc, 1А11-Fc и ВМ-Fc к ВСМА человека (серийно разбавленных в 5 раз от начальной концентрации 252 нМ до 7 концентраций) каждое смешивали со 100 нг/мл рекомбинантного белка ВСМА-His, конъюгированного с биотином (ACRO, № продукта в каталоге ВСА-H522y) в соотношении по объему 1:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, смеси добавляли в микропланшет, в который добавляли рекомбинантный белок APRIL (ACRO, № продукта в каталоге APL-H5244) фиксировали, и тем временем добавляли

контрольную группу, в которую добавляли только 50 нг/мл рекомбинантного белка ВСМА-His, конъюгированного с биотином. Планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, и затем промывали для удаления несвязанного рекомбинантного белка ВСМА-His, конъюгированного с биотином. Добавляли HRP-конъюгированный (HRP - пероксидаза хрена) стрептавидин (eBioscience, № продукта в каталоге № 18-4100-51), и планшет промывали 5 раз, и затем подвергали проявлению цвета. Измеряли значения сигнала поглощения света при длине волны 450 нм и эталонной длине волны 650 нм. Степень блокирования каждой концентрацией каждого образца антитела для значения сигнала связывания ВСМА с APRIL рассчитывали по формуле: степень блокирования = (значение сигнала контрольной группы - значение сигнала образца)/значение сигнала контрольной группы × 100%, и кривую подгоняли. Результаты представлены на фиг. 3 и в таблице 3. Все 1A1-Fc, 1B10-Fc, 1A10-Fc и 1A11-Fc могут эффективно блокировать связывание APRIL с ВСМА.

Как показано на фиг. 4А, аминокислотная последовательность внеклеточной области ВСМА человека (SEQ ID NO: 35) отличается от аминокислотной последовательности внеклеточной области ВСМА яванского макака (SEQ ID NO: 36) наличием Gly6, Ala20, Ile22, Asn31, Val45 и Thr52. Имели место перекрестные реакции клонов 1A10 и 1A11 с белком ВСМА яванского макака, на основании которых предполагается, что возможные эпитопы двух клонов расположены в Gln7-His19, и/или Pro23-Ser30, и/или Asn31-Ser44, и/или Thr46-Gly51. На фиг. 4В показана структура внеклеточной области ВСМА человека в базе данных PDB (PDB № 2kn1). Как показано на фиг. 4А и 4В, ВСМА человека содержит 3 пары дисульфидных связей во внеклеточной области: Cys8-Cys21, Cys24-Cys37 и Cys28-Cys41; ВСМА человека и APRIL в основном связываются со структурой β-шпильки (Bossen, C. et al. Semin. Immunol. 2006, 18(5):263-275), на основании которого предполагается, что основные сайты связывания клонов 1A10-Fc и 1A11-Fc расположены в Gln7-His19, и/или Pro23-Ser30, и/или Asn31-Ser44.

Таблица 3. Антитело V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека блокирует связывание APRIL с ВСМА

Химерное антитело	IC50 (нМ)
V <sub>H</sub> H-Fc	
1A1-Fc	0,34
1A10-Fc	0,41
1A11-Fc	0,76
1B10-Fc	0,26

Пример 6. Анализ различий эпитопов между различными клонами V<sub>H</sub>N к ВСМА человека

6.1 Исследование конкурентных отношений между различными клонами V<sub>H</sub>N к ВСМА человека с помощью ELISA (метод шахматной доски)

Химерные антитела V<sub>H</sub>N-Fc к ВСМА человека разбавляли до 2 мкг/мл и оставляли для покрытия планшета с высокой адсорбцией. Планшет промывали, и затем блокировали. 20 мкг/мл антител V<sub>H</sub>N-Fc к ВСМА человека инкубировали с конъюгированным с биотином белком ВСМА-His (ACRO, № продукта в каталоге ВСА-H522у) при комнатной температуре в течение 0,5 ч с получением смесей антигена и антитела. В соответствии с шахматной доской инкубированные смеси антигена и антитела или только конъюгированный с биотином белок ВСМА-His (контрольная группа) последовательно добавляли в луночный планшет при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, и затем промывали для удаления несвязанного рекомбинантного белка ВСМА-His, конъюгированного с биотином. Добавляли HRP-конъюгированный (HRP - пероксидаза хрена) стрептавидин (eBioscience, № продукта в каталоге № 18-4100-51), и планшет промывали 5 раз, и затем подвергали проявлению цвета. Измеряли значения сигнала поглощения света при длине волны 450 нм и эталонной длине волны 650 нм. Степень блокирования одного антитела для сигнала связывания другого антитела с ВСМА-Bio рассчитывали по формуле: степень блокирования = (значение сигнала контрольной группы - значение сигнала группы образца)/значение сигнала контрольной группы × 100%. Полученные результаты приведены в Таблице 4. Положительные контрольные группы, в которых антитела конкурировали сами с собой, показаны на диагональной линии «\» шахматной доски (отмечена серым цветом). Частота блокировок составила 99% и более. Скорость блокирования 1A10-Fc для связывания 1A11-Fc с ВСМА человека (32,6%) составляла менее 50%, как и скорость блокирования 1A11-Fc для связывания 1A10-Fc с ВСМА человека (21,6%), что указывает на отсутствие существенной конкурентной связи между 1A10-Fc и 1A11-Fc и на то, что 1A10-Fc и 1A11-Fc могут связываться с различными эпитопами белка ВСМА одновременно. Аналогичным образом, не было значимых конкурентных связей между 1A10-Fc и 1A1-Fc, 1A10-Fc и 1B10-Fc, что указывает на то, что 1A10-Fc и 1A1-Fc могут связываться с различными эпитопами белка ВСМА одновременно, и что 1A10-Fc и 1B10-Fc могут связываться с различными эпитопами белка ВСМА одновременно. Скорость взаимного блокирования 1A1-Fc, 1A11-Fc и 1B10-Fc составляет более 99%.

Таблица 4. Конкуренция эпитопов ELISA (метод шахматной доски)

Метод шахматной доски	1A1-Fc	1A10-Fc	1A11-Fc	1B10-Fc
1A1-Fc	100,1%	7,6%	99,4%	101,2%
1A10-Fc	36,9%	100,4%	32,6%	46,4%
1A11-Fc	100,6%	21,6%	99,7%	99,4%
1B10-Fc	100,3%	26,7%	99,5%	100,6%

## 6.2 Анализ различий эпитопов с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Анализ конкурентных отношений эпитопов проводили с использованием системы анализа биомолекулярного взаимодействия (GE, Biacore T200). Антитело к His (GE, № продукта в каталоге 28995056) аминокислоты связывали с сенсорным чипом CM5. Белок ВСМА-His (ACRO, № продукта в каталоге ВСА-H522у) разбавляли подвижным буфером до около 1 мкг/мл и захватывание проводили пропусканием раствора через экспериментальный канал со скоростью потока 30 мкл/мин. Сигнал захвата контролировали при 180-190 RU (резонансная единица) путем корректировки времени связывания. Химерное антитело V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека V<sub>H</sub>H-Fc 1 разбавляли до 10 мкг/мл (концентрация насыщения; значение сигнала связывания оставалось неизменным после увеличения концентрации) с помощью подвижного буфера и вводили до тех пор, пока сигналы не достигали плато. По завершении инъекции вводили другое химерное антитело V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека V<sub>H</sub>H-Fc2. Наблюдали кривые связывания антител и регистрировали значения сигнала связывания для обоих антител отдельно. Изменения значений сигнала приведены в таблице 5. Значение сигнала для насыщенного связывания антитела 1A10-Fc с ВСМА составляло 472,5 RU. В это время вводили 1A11-Fc, и значение насыщенного сигнала составляло 579,0 RU, что сопоставимо со значением насыщенного сигнала 653,1 RU при введении только 1A11-Fc. И наоборот, инъекции и по потоку и против потока приводили к сопоставимым совокупным значениям сигналов, что указывает на то, что 1A10-Fc и 1A11-Fc могут связываться с различными эпитопами белка ВСМА одновременно.

Таблица 5. Изменения в значениях сигнала SPR антител V<sub>H</sub>H-Fc и анализ

Сигнал захвата	V <sub>H</sub> H-Fc1	V <sub>H</sub> H-Fc2	Сигнал связывания	Сигнал связывания	Суммарное значение
----------------	----------------------	----------------------	-------------------	-------------------	--------------------

	BCMA (RU)		VNH-Fc1 (RU)	VNH-Fc2 (RU)	сигнала (RU)	
Цикл 1	184,0	1A10-Fc	A11-Fc	472,5	579,0	1051,5
Цикл 2	184,6	1A11-Fc	A10-Fc	653,1	405,5	1058,6

### 6.3 Анализ различных эпитопов с помощью проточной цитометрии

Поскольку белок BCMA, экспрессируемый на клеточных мембранах, может отличаться от свободного белка эффективным воздействием эпитопов, дополнительно определяли с помощью проточной цитометрии, могут ли два клона 1A10 и 1A11 одновременно связываться с белком BCMA на клеточных мембранах. Клетки-мишени представляли собой клетки U266. 20 мкг/мл или 10 мкг/мл каждого антитела 1A10-Fc и 1A11-Fc использовали для инкубации  $2 \times 10^5$  клеток-мишеней; или 20 мкг/мл антитела 1A10-Fc смешивали с 20 мкг/мл антитела 1A11-Fc в объемном соотношении 1:1, и смесь использовали для инкубации  $2 \times 10^5$  клеток-мишеней. После инкубации на льду в течение 1 часа клетки промывали. Добавляли меченное PE (фикоэритрин) антитело к Fc IgG человека (Jackson Immuno Research, № продукта в каталоге 109-116-170) и инкубировали смесь на льду в течение 0,5 ч. Клетки промывали, и затем тестировали с помощью проточного цитометра (Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NXT). Результаты представлены в Таблице 6. При добавлении идентичного 10 мкг/мл антитела процентное увеличение среднего значения флуоресценции для образца 1A10-Fc составляло  $902,0/823,5 - 1 = 9,5\%$ , и процентное увеличение среднего значения флуоресценции для образца 1A11-Fc составляло  $702,0/697,5 - 1 = 0,6\%$ , что указывает на то, что концентрация при 10 мкг/мл обоих антител была близка к концентрациям насыщения. На основании вышеизложенного добавляли 10 мкг/мл другого антитела: когда 10 мкг/мл 1A11-Fc добавляли к 10 мкг/мл 1A10-Fc, процентное увеличение среднего значения флуоресценции составляло  $1443,5/823,5 - 1 = 75,3\%$ ; когда 10 мкг/мл 1A10-Fc добавляли к 10 мкг/мл 1A11-Fc, процентное увеличение среднего значения флуоресценции составляло  $1443,5/697,5 - 1 = 107,0\%$ , что указывает на то, что два антитела 1A10-Fc и 1A11-Fc могли связываться с различными эпитопами белка BCMA на клеточных мембранах одновременно.

Таблица 6. Связывание химерных антител VNH к BCMA человека с клетками U266

№	Химерное антитело VNH-Fc	Среднее значение флуоресценции
---	-----------------------------	-----------------------------------

		(MFI)
a	1A10-Fc, 10 мкг/мл+	1443,5
	1A11-Fc, 10 мкг/мл	
b	1A10-Fc, 20 мкг/мл	902,0
c	1A11-Fc, 20 мкг/мл	702,0
d	1A10-Fc, 10 мкг/мл	823,5
e	1A11-Fc, 10 мкг/мл	697,5

Пример 7. Конструирование, экспрессия и очистка химерных моноклональных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека и их гуманизированных моноклональных антител

Химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc 1A10-Fc и 1A11-Fc были гуманизированы отдельно, при этом два гуманизированных антитела, 1A10-V1 и 1A10-V2, соответственно, были получены после гуманизации химерного антитела 1A10-Fc; два гуманизированных антитела, 1A11-V1 и 1A11-V2, соответственно, были получены после гуманизации химерного антитела 1A11-Fc. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности антител, описанных выше, показаны в таблице 7.

Последовательности ДНК, кодирующие химерные антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека и их гуманизированные антитела (SEQ ID NO: 30, 52, 54, 32, 56, 58, см. Таблицу 7 для соответствующих наименований), синтезировали и клонировали в векторы экспрессии pсDNA3.1(+), соответственно. Каждое антитело экспрессировали с использованием набора экспрессии ExpiCHO (Thermo Fisher, № продукта в каталоге A29133). Сконструированный экспрессионный вектор, содержащий последовательность ДНК антитела, сначала трансфицировали в клетки ExpiCHO (CHO-S, Thermo), и клетки культивировали в экспрессионной среде ExpiCHO в увлажненной атмосфере в инкубаторе при 37 °С с 8% CO<sub>2</sub> на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 130 об/мин. Супернатант культуры собирали и проводили очистку белка с использованием магнитных гранул белка А (Genscript, № продукта в каталоге L00273). Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра UV-Vis (NanoDrop lite, Thermo Scientific).

Таблица 7. Информация о последовательности химерного моноклонального антитела V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека и его гуманизированного моноклонального антитела

Наименование	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:)	Кодирующая последовательность	Примечание



		тельность ДНК (SEQ ID NO:)	
1A10-Fc	<p>QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGY SSNVACMAWYRQAPGKEREWVATIVA DFGTTNYAASVKGRFTISQDNAKNTVYL QMNSLKPEDSAMYYCAATQRGGIDWC DEINYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 29</p>	SEQ ID NO: 30	Химерное антитело верблюда и человека
1A10-V1	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYS SNVACMAWYRQAPGKGLEWVATIVAD FGTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDE INYWGQGTLVTVSSGEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 51</p>	SEQ ID NO: 52	Гуманизиро ванное антитело
1A10-V2	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYS SNVACMAWYRQAPGKEREWVSTIVADF GTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQ</p>	SEQ ID NO: 54	Гуманизиро ванное антитело

	<p>MNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDE          INYWGQGLVTVSSGEPKSSDKTHTCPP          CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT          PVEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE          VHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH          QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK          AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT          CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT          PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN          VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK          SEQ ID NO: 53</p>		
1A11-Fc	<p>QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGV          TFNSACMGWFRQAPGKEREVARIETG          YGGTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYL          QMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTPTW          WHELDYNYWGQGTQVTVSSEPKSCDKT          HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM          ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD          GVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT          VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK          TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ          VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN          YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ          QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP          GK          SEQ ID NO: 31</p>	SEQ ID NO: 32	Химерное антитело верблюда и человека
1A11-V1	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT          FNSACMGWFRQAPGKGREGVSRIETGY          GGTVYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ          MNSLRAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWW          HELDYNYWGQGTQVTVSSGEPKSSDKT          HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM          ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD          GVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT          VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK</p>	SEQ ID NO: 56	Гуманизиро ванное антитело

	<p>TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK SEQ ID NO: 55</p>		
1A11-V2	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNSACMGWFRQAPGKEREGVSRIETGY GGTVYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLKAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWW HELDYNYWGQGTQVTVSSGEPKSSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK SEQ ID NO: 57</p>	SEQ ID NO: 58	Гуманизиро ванное антитело

Пример 8. Связывание химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к BCMA человека и их гуманизированных антител с антигеном BCMA человека

Аффинность тестируемого антитела к белку BCMA человека определяли с помощью Biacore T200 (GE) следующим образом:

Определенное количество тестируемого антитела (включая 1A10-Fc, 1A11-Fc, 1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1 и 1A11-V2) захватывали с помощью чипа CM5 (Cytiva, № продукта в каталоге 29149603), соединенного с Anti-hIgG (Cytiva, № продукта в каталоге 29234600), и затем BCMA человека пропускали через поверхность чипа. Ответные сигналы были обнаружены в режиме реального времени с использованием программного обеспечения Biacore, и были получены кривые ассоциации и диссоциации. Буфер, используемый в эксперименте, представлял собой универсальный буфер Biacore (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% поверхностно-активное вещество P-20 (мас./об.), pH 7,4). Anti-hIgG связывали с поверхностью чипа CM5 при

значении отклика до около 9000 RU, и тестируемое антитело (включая 1A10-Fc, 1A11-Fc, 1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1 и 1A11-V2) захватывали при около 200 RU. Затем измеряли значения сигналов взаимодействия различных концентраций ВСМА человека (100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ) с тестируемым антителом (включая 1A10-Fc, 1A11-Fc, 1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1 и 1A11-V2). Скорость потока в проточной ячейке составляла 50 мкл/мин, ассоциацию проводили в течение 240 с, диссоциацию проводили в течение 1400 с, регенерацию проводили с использованием 3 М MgCl<sub>2</sub> (GE) в течение 60 с, и исходный уровень был стабильным. Результаты были получены путем расчета в соответствии с режимом аффинности и кинетики связывания 1:1 в программном обеспечении для оценки Biacore. Аффинность химерных антител V<sub>H</sub>H к ВСМА-Fc человека и их гуманизированных антител (включая 1A10-Fc, 1A11-Fc, 1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1 и 1A11-V2) к ВСМА человека показана в таблице 8.

Таблица 8. Аффинность связывания химерных антител V<sub>H</sub>H-Fc к ВСМА человека и их гуманизированных антител с антигеном ВСМА человека

Наименование	Примечание	Антиген ВСМА (KD)
1A10-Fc	Химерное антитело верблюда и человека	0,94 нМ
1A10-V1	Гуманизированное антитело	0,337 нМ
1A10-V2	Гуманизированное антитело	1,31 нМ
1A11-Fc	Химерное антитело верблюда и человека	3,96 нМ
1A11-V1	Гуманизированное антитело	5,05 нМ
1A11-V2	Гуманизированное антитело	4,37 нМ

Пример 9. Конструирование, экспрессия и очистка мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3

Мультиспецифические антитела к ВСМА/к CD3 получали в виде человеческого IgG1 методом Fc-инженерии «выступ-во-впадину» (Ridgway, et al., 1996). Мутации H435R и Y436F (Jendeberg et al., 1997) были сконструированы в последовательности одного полипептида Fc-домена для снижения аффинности Fc к белку A, что было благоприятно для удаления гомодимеров, образующихся при сборке мультиспецифических антител при аффинной очистке белка A.

В этом примере были сконструированы четыре мультиспецифических антитела к

BCMA/к CD3, описанные в настоящем документе, называемые BC24, PC1, PC2 и PC3, соответственно, причем конфигурация BC24 показана на фиг. 6А, конфигурация PC1 показана на фиг. 6В, конфигурация PC2 показана на фиг. 6С, и конфигурация PC3 показана на фиг. 6D. В сконструированных мультиспецифических антителах антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, был получен из химерного антитела V<sub>H</sub>H-Fc к BCMA человека и его гуманизированного антитела, и антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD3, был получен путем гуманизации антитела sp34 (Silvana Pessano, et al., The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3-epsilon) subunits, EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337-344).

Мультиспецифическое антитело BC24 к BCMA/к CD3 имеет три полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь (называемая A10-линкер-A11-Fc) содержит два антигенсвязывающих домена, связывающихся с BCMA, связанных в тандеме, два антигенсвязывающих домена, связывающихся с BCMA, получены из одиночных переменных доменов 1A10-Fc и 1A11-Fc, соответственно, и полипептидная цепь A10-линкер-A11 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60; две другие полипептидные цепи мультиспецифического антитела BC24 к BCMA/к CD3, называемого анти-CD3-HC-Fc (содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62) и анти-CD3-LC (содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64), соответственно, образуют структуру, содержащую антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD3 в форме Fab.

Мультиспецифическое антитело PC1 к BCMA/к CD3 имеет две полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь (названная анти-BCMA-A10-v1-линкер-A11-v1-Fc) содержит два антигенсвязывающих домена, связывающихся с BCMA, связанных в тандеме, два антигенсвязывающих домена, связывающихся с BCMA, получены из одиночных переменных доменов гуманизированных антител 1A10-V1 и 1A11-V1, соответственно, N-конец одного полипептида Fc слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с BCMA (полученным из 1A11-V1), и полипептидная цепь, анти-BCMA-A10-v1-линкер-A11-v1-Fc, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65 и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66; другая полипептидная цепь мультиспецифического антитела PC1 к BCMA/к CD3 (называемого анти-CD3-scFv-Fc) содержит антигенсвязывающий домен,

связывающийся с CD3, структура ScFv которого образована tandemным соединением переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, связывающейся с CD3, N-конец другого полипептида Fc слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с CD3, и полипептидная цепь анти-CD3-scFv-Fc содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67 и нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68.

Мультиспецифическое антитело PC2 к BCMA/к CD3 имеет две полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь (называемая анти-BCMA-A10-v1-Fc) содержит антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, получен из одного переменной домена гуманизированного антитела 1A10-v1, N-конец одного полипептида Fc слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с BCMA, и полипептидная цепь, анти-BCMA-A10-v1-Fc, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70; другая полипептидная цепь мультиспецифического антитела PC2 к BCMA/к CD3 (называемого анти-BCMA-A11-v1-линкер-анти-CD3-scFv-Fc) содержит антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD3, и антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, связанный в tandemе, структура ScFv антигенсвязывающего домена, связывающегося с CD3, образована tandemным соединением переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, связывающейся с CD3, антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, получен из одного переменной домена гуманизированного антитела 1A11-v1, N-конец другого полипептида Fc слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с CD3, и полипептидная цепь анти-BCMA-A11-v1-линкер-анти-CD3-scFv-Fc содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72.

Мультиспецифическое антитело к BCMA/к CD3 PC3 имеет три полипептидные цепи, причем одна полипептидная цепь (называемая анти-BCMA-A11-v1-Fc) содержит антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, антигенсвязывающий домен, связывающийся с BCMA, получен из одиночного переменной домена гуманизированного антитела 1A11-v1, N-конец одного полипептида Fc слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с BCMA, и полипептидная цепь, анти-BCMA-A11-v1-Fc, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74; две другие полипептидные цепи мультиспецифического антитела PC3 к BCMA/к CD3 образуют структуру, содержащую антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD3 в

форме Fab, N-конец легкой цепи Fab слит с антигенсвязывающим доменом, связывающимся с ВСМА, антигенсвязывающий домен, связывающийся с ВСМА, получен из одиночного варибельного домена гуманизированного антитела 1A10-v1, N-конец другого полипептида Fc слит с тяжелой цепью Fab антигенсвязывающего домена, связывающегося с CD3, и две полипептидные цепи называются анти-CD3-НС-Fc (содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62) и анти-ВСМА-A10-v1-линкер-анти-CD3-VL (содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76), соответственно.

В этом примере биспецифическое антитело к ВСМА/к CD3 от Celgene Corporation использовали в качестве контрольного антитела, и последовательность была получена из US20190263920A1. Эталонное биспецифическое контрольное антитело к ВСМА/к CD3 (для краткости celgene BM) в этом примере содержит два антигенсвязывающих домена, связывающихся с ВСМА в форме Fab, и антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD3 в форме Fab, причем одно плечо анти-ВСМА находится в структурной форме анти-ВСМА-Fab-Fc, содержащей полипептидные цепи анти-ВСМА-НС-Fc (содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78) и анти-ВСМА-LC (содержащую набор аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 79 и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80), и точечные мутации H435R и Y436F добавляли в анти-ВСМА-НС-Fc (SEQ ID NO: 77), тем самым улучшая выход процесса очистки; структура другого плеча BM к ВСМА/к CD3 биспецифического контрольного антитела BM к ВСМА/к CD3 находится в структурной форме анти-ВСМА-Fab-CD3-Fab-Fc, содержащей полипептидные цепи анти-ВСМА-VH-anti-CD3-VL-Fc (содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82), анти-CD3-VH-CL (содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84) и анти-ВСМА-LC (содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, и нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80).

Для каждого антитела к ВСМА/к CD3 последовательности ДНК каждой полипептидной цепи для кодирования и составления антитела встраивали в векторы pCDNA3.1(+), соответственно, для получения векторов экспрессии, экспрессирующих соответствующие полипептидные цепи. Экспрессия белка определялась промотором

CMV. Полиаденилирование осуществляли с помощью синтетической сигнальной последовательности polyA, расположенной на 3'-конце CDS. Кроме того, каждый вектор содержал последовательность Ori для автономной репликации.

Для получения данных молекул антител каждую комбинацию антител экспрессировали с использованием набора экспрессии ExpiCHO (Thermo Fisher, № продукта по каталогу A29133). Во-первых, соответствующий экспрессионный вектор трансфицировали в клетки ExpiCHO (CHO-S, Thermo) в определенном соотношении (соотношение трансфекции в PC1: вектор (анти-BCMA-A10-v1-линкер-A11-v1-Fc):вектор (анти-CD3-scFv-Fc) составляло 1:1,5; соотношение трансфекции в PC2: вектор (анти-BCMA-A10-v1-Fc):вектор (анти-BCMA-A11-v1-линкер-анти-CD3-scFv-Fc) составляло 1:1,5; соотношение трансфекции в PC3: вектор (анти-BCMA-A11-v1-Fc): вектор (анти-CD3-НС-Fc):вектор (анти-BCMA-A10-v1-линкер-анти-CD3-VL) составляло 1:1,5:1,5; соотношение трансфекции в celgene BM: вектор (анти-BCMA-НС-Fc):вектор (анти-BCMA-LC):вектор (анти-BCMA-VH-анти-CD3-VL-Fc):вектор (анти-CD3-VH-CL) составляло 1:2:1:1,5; соотношение трансфекции в BC24: вектор (A10-линкер-A11-Fc):вектор (анти-CD3-НС-Fc):вектор (анти-CD3-LC) составляло 1:1,5:2) и клетки культивировали в среде экспрессии ExpiCHO во влажной атмосфере в инкубаторе при 37 С с 8% CO<sub>2</sub> на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 130 об/мин. Супернатант клеточной культуры собирали через 10-14 дней культивирования и клетки удаляли центрифугированием. Супернатант очищали с помощью аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии и гель-хроматографии в системе очистителя АКТА 100 (GE).

Концентрацию белка образца очищенного белка определяли путем измерения оптической плотности (OD) при 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции, рассчитанной на основе аминокислотной последовательности.

Собранные образцы во всех пробирках фракции анализировали на чистоту методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Конкретный метод: содержание агрегатов молекул анализировали с использованием колонки эксклюзионной хроматографии ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column при 25 °С с 16 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 34 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 мМ NaCl и подвижного буфера с рН 7,0. Согласно результатам SEC, образцы с чистотой более 95% объединяли.

Полный молекулярно-массовый анализ проводили с использованием системы LC-MS Waters (Waters, Сингапур, США, Великобритания). Использовали хроматографическую колонку MAbPac RP 4 мкм 2,1×50 мм (Thermo, США). В качестве подвижных фаз использовали фазу А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и фазу



В (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле), и длина волны обнаружения составляла 280 нм. 1 мкг белка вводили в систему жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии с градиентом от 5% В до 100% В в течение 5,5 мин. Использовали масс-спектрометр в режиме положительных ионов, и диапазон сканирования составил 200-4000 m/z (масса/заряд). Данные собирали с использованием MassLynx 4.1 и обрабатывали с помощью UNIFI 1.8.2.169. Анализ LC-MS показывает, что измеренная молекулярная масса каждого образца антитела к ВСМА/к CD3 согласуется с теоретической молекулярной массой; на фиг. 18 показан полный результат определения молекулярной массы PC1, молекулярная масса основного пика образца составляет 108516 Да, что согласуется с теоретической молекулярной массой PC1, и пик гомологичной примеси не виден.

Таблица 9. Информация о последовательности мультиспецифического антитела к ВСМА/к CD3

Наименование	Композиция	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:)	Нуклеотид (SEQ ID NO:)
BC24	A10-линкер- A11-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA SGYSSNVACMAWYRQAPGKEREW VATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQ DNAKNTVY LQMNSLKPEDSAMY Y CAATQRGGIDWCDEINYWGQGT L VTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGG GSVQAGGSLRLSCAASGVTFNSAC MGWFRQAPGKEREGVARIETGYG GTVYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWC TPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS GEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN	SEQ ID NO: 60

		GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSVSMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 59	
	анти-CD3- HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAM YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62
	анти-CD3- LC	ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTITGVQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64

PC1	анти-BCMA- A10-v1- линкер-A11- v1-Fc	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA          SGYSSNVACMAWYRQAPGKGLEW          VATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQ          DNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY          CAATQRGGIDWCDEINYWGQGT          LVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGG          GLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSAC          MGWFRQAPGKGREGVSRIETGYG          GTVYADSVKGRFTISRDNKNTVY          LQMNSLRAEDTAVYYCAAKRSWC          TPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS          GEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPS          VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV          DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA          KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ          DWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT          ISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK          NQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESN          GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK          LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL          HNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>SEQ ID NO: 65</p>	SEQ ID NO: 66
	анти-CD3- scFv-Fc	<p>ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSS          TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRG          LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA          ALTITGVQPEDEAEYYCALWYSNL          WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSG          GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL          SCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK          GLEWVARIRSKYNNYATYYADSV          KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT          EDTAMYVCVRHGNFGNSYVSWFA          YWGQGT LVTVSSGEPKSSDKTHTC          PPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL          MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF</p> <p>SEQ ID NO: 68</p>	SEQ ID NO: 68

		<p>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  KVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP  QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV  KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSL  SLSPGK</p> <p>SEQ ID NO: 67</p>	
PC2	анти-BCMA- A10-v1-Fc	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA  SGYSSNVACMAWYRQAPGKGLEW  VATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQ  DNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYY  CAATQRGGIDWCDEINYWGQGTL  VTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEA  AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA  APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR  EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS  FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  MHEALHNHYTQKLSLSPGK</p> <p>SEQ ID NO: 69</p>	SEQ ID NO: 70
	анти-BCMA- A11-v1- линкер- анти-CD3- scFv-Fc	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA  SGFTFNSACMGWFRQAPGKGREG  VSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISR  DNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYY  CAAKRSWCTPTWWHELDYNYWG  QGTQVTVSSGGGGSELVVTQEPSL  TTSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA  NWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP  GTPARFSGSLLGGKAALTITGVQPE  DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKL</p>	SEQ ID NO: 72

		<p>TVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLV  ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN  TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS  KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS  KNTAYLQMNNLKTEDTAMYYCVR  HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV  SSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV  VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE  MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE  WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  MHEALHNRFYTKSLSLSPGK  SEQ ID NO: 71</p>	
PC3	анти-BCMA- A11-v1-Fc	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA  SGFTFNSACMGWFRQAPGKREG  VSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISR  DNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY  CAAKRSWCTPTWWHELDYNYWG  QGTQVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCP  APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVC  TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY  PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD  SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPG  K  SEQ ID NO: 73</p>	SEQ ID NO: 74

	<p>анти-CD3- HC-Fc</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAM YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 61</p>	<p>SEQ ID NO: 62</p>
	<p>анти-BCMA- A10-v1- линкер- анти-CD3- VL</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYSSNVACMAWYRQAPGKGLEW VATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQ DNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CAATQRGGIDWCDEINYWGQGT LTVSSGGGGSELVVTQEPLTSPG GTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTITGVQPEDEAEY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQ PKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS</p>	<p>SEQ ID NO: 76</p>

		SEQ ID NO: 75	
Celgene BM	анти-BCMA- HC-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKVLGWFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN RFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
	анти-BCMA- LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
	анти-BCMA- VH-анти- CD3-VL-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR	SEQ ID NO: 82

		<p>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY  CAKVLGWFDYWGGTLVTVSSAS  TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP  KSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSL  TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNY  ANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAP  GTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPE  DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKL  TVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG  GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP  IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD  ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE  WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  FLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>SEQ ID NO: 81</p>	
	<p>анти-CD3-  VH-CL</p>	<p>EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAA  SGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEW  VSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI  SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT  LTVVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS  GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV  DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS  LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</p> <p>SEQ ID NO: 84</p>	



		QGLSSPVTKSFNRGEC	
		SEQ ID NO: 83	

Пример 10. SPR связывания мультиспецифического антитела и антигена к ВСМА/к CD3

Аффинность тестируемого антитела к белку CD3е человека или ВСМА человека определяли с помощью Biacore T200 (GE) следующим образом:

Определенное количество антитела к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) было захвачено чипом CM5 (Cytiva, № продукта в каталоге 29149603), соединенным с Anti-hIgG (Cytiva, № продукта в каталоге 29234600), и затем CD3е человека (Асто, № продукта в каталоге CDE-H5223) или ВСМА человека пропускали через поверхность чипа. Ответные сигналы были обнаружены в режиме реального времени с использованием программного обеспечения Biacore, и были получены кривые ассоциации и диссоциации. Буфер, используемый в эксперименте, представлял собой универсальный буфер Biacore (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% поверхностно-активное вещество P-20 (мас./об.), pH 7,4). Антитело к IgG связывали с поверхностью чипа CM5 при значении отклика до около 9000 RU, и антитело к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) захватывали при около 200 RU. Затем измеряли значения сигналов взаимодействия различных концентраций белка CD3е человека (100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ) или ВСМА человека (100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ) с антителом к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM). Скорость потока в проточной ячейке составляла 50 мкл/мин, ассоциацию проводили в течение 240 с, диссоциацию проводили в течение 1400 с, регенерацию проводили с использованием 3 М MgCl<sub>2</sub> (GE) в течение 60 с, и исходный уровень был стабильным. Результаты были получены путем расчета в соответствии с режимом аффинности и кинетики связывания 1:1 в программном обеспечении для оценки Biacore. Аффинность антитела к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) к белку CD3е человека или ВСМА человека показана в таблице 10.

Таблица 10. Аффинность антитела к ВСМА/к CD3 к белку CD3е человека или белку ВСМА человека

Наименование	Антиген hBCMA (KD)	Антиген hCD3е (KD)
BC24	0,0627 нМ	0,286 нМ

PC1	0,0396 нМ	1,43 нМ
PC2	0,0185 нМ	1,33 нМ
PC3	0,0347 нМ	1,17 нМ
Celgene BM	0,821 нМ	1,60 нМ

Пример 11. Связывание мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с ВСМА на поверхности клеток множественной миеломы

Связывание антитела к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) с ВСМА в клетках NCI-H929, экспрессирующих ВСМА (клеточный штамм, экспрессирующий ВСМА на высоких уровнях, от Nanjing Cobioer Biosciences), клетках MM1S (клеточный штамм, экспрессирующий ВСМА на средних уровнях, от Veina Bio) и клетках RPMI-8226 (клеточный штамм, экспрессирующий ВСМА на низких уровнях, от Cell Resource Center, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences) анализировали с помощью проточной цитометрии, и отрицательным образцом был трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки NCI-H929 (ВСМА+++), клетки MM1S (ВСМА++) и клетки RPMI-8226 (ВСМА+) в логарифмической фазе роста отбирали, доводили до плотности клеток  $5 \times 10^6$ - $10 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды RPMI (HyClone, № продукта в каталоге SH30809.01), содержащей 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), соответственно, и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток с U-образным дном (Costar, № продукта в каталоге 3799) при 50 мкл на лунку. Тестируемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды, описанной выше. Для клеток, экспрессирующих ВСМА на высоких и средних уровнях, самая высокая концентрация антител составляла 440 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 9 градиентов концентрации. Для клеток, экспрессирующих ВСМА на низких уровнях, самая высокая концентрация антител составляла 2200 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку, хорошо перемешивали и инкубировали при 4 °С в течение 1 часа. Клетки промывали предварительно охлажденным подвижным буфером (MACS, № продукта в каталоге 130-091-221) и супернатант отбрасывали. Добавляли предварительно охлажденные флуоресцентно меченые козы антитела к IgG человека (Jackson, № продукта в каталоге 109-116-170), и клетки ресуспендировали при 100 мкл на лунку, хорошо перемешивали и инкубировали при 4 °С

в течение 30 минут. После промывки добавляли 100 мкл предварительно охлажденного подвижного буфера для ресуспендирования клеток. Клетки хорошо перемешивали и собирали во время течения на проточном цитометре Attune™ NxT, и данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism5.

На фиг. 7-9 и в таблице 11 показана способность мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 связываться с клетками NCI-H929 (ВСМА+++), клетками MM1S (ВСМА++) и клетками RPMI-8226 (ВСМА+). Результаты показывают, что в клетках-мишенях, экспрессирующих ВСМА на высоких уровнях и на средних уровнях, максимальное количество связывания PC1, PC2, PC3 и BC24 для антигена-мишени лучше, чем у Celgene BM. В клетках-мишенях, экспрессирующих ВСМА на низких уровнях, связывание PC3 и BC24 с антигеном-мишенью лучше, чем у других образцов.

Таблица 11. Значение связывания EC<sub>50</sub> и максимальное количество связывания каждого испытуемого образца в разных клетках с клетками-мишенями

Наименование образца	NCI-H929		MM1S	
	EC <sub>50</sub> (нМ)	Максимальное (MFI)	EC <sub>50</sub> (нМ)	Максимальное (MFI)
Celgene BM	0,8207	165553	0,3808	71438
BC24	1,556	185797	0,535	106924
PC1	1,261	226017	0,3503	100056,5
PC2	1,035	233759	0,311	114684
PC3	0,8366	222679,5	0,3378	123519
Отрицательный контроль	67,32	4046	/	7405

Пример 12. Связывание мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с CD3 поверхности Т-клеток

Связывание антитела к ВСМА/к CD3 (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) с CD3 на поверхности Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. Отрицательный контроль представлял собой трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки РВМС человека сортировали на CD3<sup>+</sup> Т-клетки с использованием магнитных частиц CD3 (Miltenyi, № продукта в каталоге 130-097-043): криоконсервированные РВМС размораживали и дважды промывали центрифугированием

для подсчета. Подвижный буфер (MACS, № продукта в каталоге 130-091-221) добавляли в соотношении клеток к буферу  $10^7$ :80 мкл, добавляли гранулы CD3 в соотношении клеток к гранулам  $10^7$ :20 мкл, и смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 4 °C в течение 15 мин. Клетки промывали буфером в соотношении клеток к буферу  $10^7$ :1-2 мл. После центрифугирования супернатант отбрасывали и добавляли 500 мкл буфера для ресуспендирования клеточного осадка. Сортировочная колонка LS (Miltenyi, № продукта в каталоге 130-042-401) помещалась на магнитную стойку MidiMACS Starting Kit (LS) (Miltenyi, № продукта в каталоге 130-091-051). После промывания добавляли клеточную суспензию и трижды промывали. Сортировочную колонку LS извлекали из магнитного штатива и помещали в чистую центрифужную пробирку, и добавляли 5 мл буфера для сбора отсортированных  $CD3^+$  Т-клеток. После подсчета  $CD3^+$  Т-клетки доводили до плотности клеток  $5 \times 10^6$ - $10 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды RPMI (Hyclone, № продукта в каталоге SH30809.01), содержащей 2% FBS (фетальная бычья сыворотка) и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток с U-образным дном (Costar, № продукта в каталоге 3799) при 50 мкл на лунку. Тестируемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды, описанной выше. Самая высокая концентрация антител составляла 2200 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку, хорошо перемешивали и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Клетки промывали предварительно охлажденным подвижным буфером (MACS, № продукта в каталоге 130-091-221) и супернатант отбрасывали. Добавляли предварительно охлажденные флуоресцентно меченые козы антитела к IgG человека (Jackson, № продукта в каталоге 109-116-170), и клетки ресуспендировали при 100 мкл на лунку, хорошо перемешивали и инкубировали при 4 °C в течение 30 минут. После промывки добавляли 100 мкл предварительно охлажденного подвижного буфера для ресуспендирования клеток. Клетки хорошо перемешивали и собирали во время течения на проточном цитометре Attune TM NxT, и данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism5.

На фиг. 10 и в таблице 12 показана способность связывания мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 с  $CD3^+$  Т-клетками. Результаты показывают, что каждое мультиспецифическое антитело к ВСМА/к CD3 может связываться с  $CD3^+$  Т-клетками.

Таблица 12. Связывание  $EC_{50}$  и максимальное количество связывания тестируемых антител с  $CD3^+$  Т-клетками

Наименование образца	EC <sub>50</sub> (нМ)	Максимальное (MFI)
Celgene BM	18,12	93499
BC24	38,34	162535
PC1	485,4	92854
PC2	~461,6	37242
PC3	85,81	98353
Отрицательный контроль	NA	5980

Пример 13. Лизис клеток-мишеней множественной миеломы NCI-H929 мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3

Эффекты лизиса, индуцированного антителами (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM), клеток-мишеней (NCI-H929 BCMA<sup>+++</sup>, от Nanjing Cobioer Biosciences), изучали с использованием Т-клеток, полученных из РВМС человека (моноклеарные клетки периферической крови). Отрицательный контроль представлял собой трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки-мишени NCI-H929 доводили до плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл, используя среду 1640 для эксперимента, содержащую 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Eppendorf, № продукта в каталоге 0030730199) при 50 мкл на лунку. Испытуемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды для эксперимента. Самая высокая концентрация антител составляла 8 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку. Эффекторные клетки РВМС человека доводили до плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды для эксперимента и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл антитела), группа клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды), группа эффекторных клеток (100 мкл РВМС человека + 100 мкл культуральной среды), группа клеток-мишеней + группа эффекторных клеток (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл культуральной среды), контрольная группа холостого раствора (200 мкл культуральной среды) и контрольная группа лизирующего раствора (200 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего

раствора) и группа максимального высвобождения клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего раствора) были установлены с соотношением эффектор к клетке-мишени 10:1 и временем совместной инкубации 24 ч за 45 мин до анализа, 20 мкл/лунку лизирующего раствора (Promega, № продукта в каталоге G182A) добавляли к группе максимального высвобождения клеток-мишеней и контрольной группе раствора для лизиса. Степень лизиса клеток измеряли с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780).

$$\text{Степень лизиса (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{группа введения}} - \text{OD}_{\text{целевая клетка + группа эффекторных клеток}})}{(\text{OD}_{\text{группа максимального высвобождения целевой клетки}} - \text{OD}_{\text{целевая группа клеток}})} \times 100\%$$

На фиг. 11 и в таблице 13 показана степень лизиса опухолевых клеток NCI-H929/BCMA+++ эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3. Эффект лизиса клеток, индуцированного к BCMA/к CD3 антителом PC1, лучше, чем у PC2 и PC3, где EC<sub>50</sub> PC1 составляет около 0,067 нМ, и EC<sub>50</sub> PC2 и PC3 составляет около 0,53 нМ и 0,19 нМ, соответственно. Эффект лизиса BC24 и Celgene BM на NCI-H929 лучше, чем у PC1, PC2 и PC3, EC<sub>50</sub> BC24 составляет около 0,022 нМ, и EC<sub>50</sub> Celgene BM составляет около 0,044 нМ.

Таблица 13. Значение EC<sub>50</sub> лизиса и максимальная степень лизиса каждого испытуемого образца в отношении клеток NCI-H929

Наименование образца	EC <sub>50</sub> (нМ)	Степень максимального лизиса
PC1	0,06736	36%
PC2	0,5268	38%
PC3	0,1871	35%
BC24	0,02177	40%
Celgene BM	0,04435	41%

Пример 14. Лизис клеток-мишеней множественной миеломы MM1S мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3

Эффекты лизиса, индуцированного антителами (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM), на клетках-мишенях (MM1S BCMA++, от Veina Bio), изучали с использованием Т-клеток, полученных из РВМС человека (моноклеарные клетки периферической крови). Отрицательный контроль представлял собой трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки-мишени MM1S доводили до плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл, используя среду 1640 для эксперимента, содержащую 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (eppendorf, № продукта в каталоге 0030730199) при 50 мкл на лунку. Испытуемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды для эксперимента. Самая высокая концентрация антител составляла 8 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку. Эффекторные клетки РВМС человека доводили до плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды для эксперимента и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл антитела), группа клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды), группа эффекторных клеток (100 мкл РВМС человека + 100 мкл культуральной среды), группа клеток-мишеней + группа эффекторных клеток (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл культуральной среды), контрольная группа холостого раствора (200 мкл культуральной среды) и контрольная группа лизирующего раствора (200 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего раствора) и группа максимального высвобождения клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего раствора) были установлены с соотношением эффектор к клетке-мишени 10:1 и временем совместной инкубации 24 ч за 45 мин до анализа, 20 мкл/лунку лизирующего раствора (Promega, № продукта в каталоге G182A) добавляли к группе максимального высвобождения клеток-мишеней и контрольной группе раствора для лизиса. Степень лизиса клеток измеряли с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780).

Степень лизиса (%) =  $(OD_{\text{группа введения}} - OD_{\text{целевая клетка + группа эффекторных клеток}}) / (OD_{\text{группа максимального высвобождения целевой клетки}} - OD_{\text{целевая группа клеток}}) \times 100\%$

На фиг. 12 и в таблице 14 показана степень лизиса опухолевых клеток MM1S/BCMA++ эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3. Эффект лизиса клеток, индуцированного мультиспецифическим антителом PC1 к BCMA/к CD3, лучше, чем у PC2 и PC3, где  $EC_{50}$  PC1 составляет около 0,0084 нМ, и  $EC_{50}$  PC2 и PC3 составляет около 0,061 нМ и 0,041 нМ, соответственно. PC3 имеет лучшую максимальную степень лизиса, и Celgene BM обладает самым слабым эффектом лизиса на MM1S, где  $EC_{50}$  составляет около 0,085 нМ, и максимальная скорость лизиса составляет 23%.

Таблица 14. Значение  $EC_{50}$  лизиса и максимальная степень лизиса каждого испытуемого образца в отношении клеток MM1S

Наименование образца	$EC_{50}$ (нМ)	Степень максимального лизиса
PC1	0,008398	26%
PC2	0,06052	28%
PC3	0,04069	36%
BC24	0,009373	21%
Celgene BM	0,08465	23%

Пример 15. Лизис клеток-мишеней множественной миеломы RPMI-8226 мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3

Эффекты лизиса, индуцированного антителами (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM), на клетках-мишенях (RPMI-8226 BCMA+, из Cell Resource Center, Института фундаментальных медицинских наук, Китайской академии медицинских наук), изучали с использованием Т-клеток, полученных из РВМС человека (моноклеарные клетки периферической крови). Отрицательный контроль представлял собой трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки-мишени RPMI-8226 доводили до плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл, используя среду 1640 для эксперимента, содержащую 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (eppendorf, № продукта в каталоге 0030730199) при 50 мкл на лунку. Испытуемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды для эксперимента. Самая высокая концентрация антител составляла 8 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку. Эффекторные клетки РВМС человека доводили до плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды для эксперимента и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл антитела), группа клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды), группа эффекторных клеток (100 мкл РВМС человека + 100 мкл культуральной среды), группа клеток-мишеней + группа эффекторных клеток (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл культуральной среды),



контрольная группа холостого раствора (200 мкл культуральной среды) и контрольная группа лизирующего раствора (200 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего раствора) и группа максимального высвобождения клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды + 20 мкл лизирующего раствора) были установлены с соотношением эффектор к клетке-мишени 10:1 и временем совместной инкубации 24 ч за 45 мин до анализа, 20 мкл/лунку лизирующего раствора (Promega, № продукта в каталоге G182A) добавляли к группе максимального высвобождения клеток-мишеней и контрольной группе раствора для лизиса. Степень лизиса клеток измеряли с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780).

$$\text{Степень лизиса (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{группа введения}} - \text{OD}_{\text{целевая клетка + группа эффекторных клеток}})}{(\text{OD}_{\text{группа максимального высвобождения целевой клетки}} - \text{OD}_{\text{целевая группа клеток}})} \times 100\%$$

На фиг. 13 и в таблице 15 показана степень лизиса опухолевых клеток RPMI-8226/BCMA+ эффекторными клетками, индуцированного мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3. Максимальная степень лизиса мультиспецифического антитела PC1 -8226 к BCMA/к CD3 на RPMI эквивалентна степени лизиса BC24, но EC<sub>50</sub> ниже; эффекты лизиса PC2 и PC3 на RPMI-8226 эквивалентны, EC<sub>50</sub> PC2 и PC3 составляет 0,0185 нМ и 0,0142 нМ, соответственно, и максимальная степень лизиса составляет 39%. Celgene BM оказывает самый слабый эффект лизиса на RPMI-8226, где EC<sub>50</sub> составляет 0,27 нМ, и максимальная скорость лизиса составляет 29%.

Таблица 15. Значение EC<sub>50</sub> лизиса и максимальная степень лизиса каждого испытуемого образца в отношении клеток RPMI-8226

Наименование образца	EC <sub>50</sub> (нМ)	Степень максимального лизиса
PC1	0,0070	29%
PC2	0,0185	39%
PC3	0,01419	39%
BC24	0,01129	29%
Celgene BM	0,2712	29%

Пример 16. Активация Т-клеток, индуцированная мультиспецифическими антителами к BCMA/к CD3

CD69 и CD25 представляют собой маркеры активации Т-клеток, и этот пример

относится к обнаружению активации Т-клеток мультиспецифическими антителами (включая BC24, PC1, PC2, PC3 и Celgene BM) в присутствии клеток-мишеней миеломы. Отрицательный контроль (NC) представлял собой трастузумаб.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки-мишени NCI-H929 и MM1S доводили до плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл, используя среду 1640 для эксперимента, содержащую 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (erpendorf, № продукта в каталоге 0030730199) при 50 мкл на лунку, соответственно. Испытуемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды для эксперимента. Самая высокая концентрация антител составляла 8 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку. Эффекторные клетки РВМС человека доводили до плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды для эксперимента и добавляли по 100 мкл на лунку. Группу введения (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл антитела), группу без введения (50 мкл культуральной среды + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл антитела), группу клеток-мишеней (50 мкл клетки-мишени + 150 мкл культуральной среды), группу эффекторных клеток (100 мкл РВМС человека + 100 мкл культуральной среды), группу клеток-мишеней + эффекторных клеток (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторной клетки + 50 мкл культуральной среды), контрольную группу холостого раствора (200 мкл культуральной среды) и отрицательное контрольное антитело NC представляло собой трастузумаб, при этом соотношение эффекторных и целевых клеток составляло 10:1, и время совместной инкубации составляло 24 часа. Смесь центрифугировали и супернатант удаляли. Клетки центрифугировали и промывали предварительно охлажденным подвижным буфером (MACS, № продукта в каталоге 130-091-221). Супернатант удаляли, добавляли 100 мкл подвижного буфера на лунку, клетки хорошо перемешивали, CD4-BV421 (BD, № продукта в каталоге 564713), CD8-PE-Cy7 (BD, № продукта в каталоге 557746), CD25-APC (BD, № продукта в каталоге 555434) и CD69-FITC (BD, № продукта в каталоге 555530) добавляли на лунку, причем каждый из них составлял 2,5 мкл, и смесь инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки промывали предварительно охлажденным подвижным буфером, добавляли 75 мкл/лунку подвижного буфера для ресуспендирования клеток, и клетки хорошо перемешивали и детектировали с помощью проточного цитометра.

На фиг. 14-15 показана степень активации Т-клеток, когда антитела к ВСМА/к CD3

находятся в концентрации 8 нМ в присутствии и отсутствии клеток-мишеней NCI-H929 или MM1S, причем ордината показывает процент CD8 или CD4-клеток, положительных по маркеру активации CD25 или CD69, и абсцисса показывает различные группы, где CD4+CD25+/CD4+ показывает процент CD4-клеток, положительных по CD25 в определенной группе, CD4+CD69+/CD4+ показывает процент CD4-клеток, положительных по CD69 в определенной группе, CD8+CD25+/CD8+ показывает процент CD8-клеток, положительных по CD25 в определенной группе, и CD8+CD69+/CD8+ показывает процент CD8-клеток, положительных по CD69 в определенной группе. Результаты показывают, что в отсутствие клеток-мишеней Т-клетки по существу не активируются, тогда как в присутствии клеток-мишеней антитела BC24, PC1, PC2 и PC3 могут активировать Т-клетки.

Пример 17. Высвобождение цитокинов, индуцированное мультиспецифическими антителами к ВСМА/к CD3

Высвобождение цитокинов, индуцированное мультиспецифическими антителами в присутствии клеток-мишеней, исследовали путем измерения содержания IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Безопасность мультиспецифических антител оценивали в соответствии с количеством высвобожденного цитокина.

Конкретные процедуры в данном случае являются следующими:

Клетки-мишени NCI-H929 доводили до плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл, используя среду 1640 для эксперимента, содержащую 2% FBS (фетальная бычья сыворотка), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (eppendorf, № продукта в каталоге 0030730199) при 50 мкл на лунку. Испытуемые антитела в различных концентрациях получали с использованием среды для эксперимента. Самая высокая концентрация антител составляла 8 нМ, и антитела разбавляли в 5 раз с получением в общей сложности 10 градиентов концентрации. Антитела в различных концентрациях добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток, описанный выше, по 50 мкл на лунку. Эффекторные клетки РВМС человека доводили до плотности клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с использованием среды для эксперимента и добавляли по 100 мкл на лунку. Стандартную группу, группу введения (50 мкл клеток-мишеней + 100 мкл эффекторных клеток + 50 мкл антитела), группу клеток-мишеней (50 мкл клеток-мишеней + 150 мкл культуральной среды), группу эффекторных клеток (100 мкл РВМС человека + 100 мкл культуральной среды), группу клеток-мишеней + группу эффекторных клеток (50 мкл клетки-мишени + 100 мкл эффекторных клеток + 50 мкл культуральной среды), группу эффекторных клеток + антитело (100 мкл эффекторных клеток + 50 мкл антитела + 50 мкл культуральной среды) и холостую контрольную группу

(200 мкл культуральной среды) при соотношении клеток-мишеней 10:1 и времени совместной инкубации 24 часа. Смесь центрифугировали и собирали супернатант. Образец обрабатывали с использованием наборов для анализа human-IL2 kit (Cisbio, № продукта в каталоге 62HIL02PEG), human-IL6 kit (Cisbio, № продукта в каталоге 62HIL06PEG), human-TNF- $\alpha$  kit (Cisbio, № продукта в каталоге 62HTNFAPEG) и human-IFN- $\gamma$  kit (Cisbio, № продукта в каталоге 62HIFNGPEG) в соответствии с инструкциями набора, и анализировали и тестировали с использованием микропланшетного ридера (Molecular Devices, модель: Paradigm).

Рассчитывали значения соотношений всех образцов. При стандартном соотношении (Net) в качестве оси Y и Log(стандартное значение концентрации) в качестве оси X четырехпараметрическую подгонку выполняли с помощью Graph Pad Prism, значения соотношения (Net) стандарта и испытуемого образца заменяли соответственно для получения соответствующего Log(значение измерения концентрации) и рассчитывали значение измерения концентрации каждого фактора испытуемого образца.

На фиг. 16 и в таблице 16 показано количество высвобождаемых цитокинов IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  после инкубации различных концентраций антител к ВСМА/к CD3 с клетками NCI-H929 и эффекторными клетками в течение 24 часов. Высвобождение IL-2 было низким для каждого тестируемого антитела. Мультиспецифические антитела BC24, PC1, PC2 и PC3, описанные в настоящем документе, имеют более низкие уровни высвобождения цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  по сравнению с Celgene BM и демонстрируют лучшую безопасность.

Таблица 16. Максимальное количество цитокинов, высвобождаемых каждым тестируемым антителом

Наименование образца	IL-2 (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)	TNF- $\alpha$ (пг/мл)	IFN- $\gamma$ (пг/мл)
PC1	112,06	964,63	302,56	5463,63
PC2	82,49	1	42,69	2841,61
PC3	97,51	3045,68	371,69	14391,37
BC24	88,07	260,3	200,25	4753,13
Celgene BM	117,37	3040,77	464,18	21552,72

Пример 18. Ингибирование роста биспецифических антител к ВСМА/к CD3 против

клеток-мишеней множественной миеломы NCI-H929 в мышинной модели опухоли

Противоопухолевую активность мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 тестировали с использованием мышинной модели клеток миеломы человека NCI-H929. Клетки NCI-H929 в концентрации  $7,5 \times 10^6$ /мышь и периферические лимфоциты человека hPBMC в концентрации  $0,5 \times 10^6$ /мышь смешивали и инокулировали в асептических условиях в правую боковую подмышечную впадину 8-10 недельных самок мышей B-NDG (от Biocytogen, сертификат № 320726200100179034). После подкожной прививки животных рандомизировали на 2 группы, когда объем опухоли достигал 100-300 мм<sup>3</sup>: i. модельная группа (контрольная группа холостого раствора, физиологический раствор); ii. группа PC1: тестируемое антитело PC1. В день 0 мышей разделяли на группы и вводили два раза в неделю в течение одной недели в дозе 1,5 мг/кг массы тела в объеме дозы 10 мл/кг. Массу и диаметр опухоли измеряли каждые три дня, и поведение мышей наблюдали ежедневно. Наблюдение было прекращено на 17 день. Во время исследования объем опухоли измеряли в дни 0, 4, 8, 11, 14 и 17. Объем опухоли и ингибирование роста опухоли рассчитывали с использованием следующих формул:

$$\text{Объем опухоли (TV)} = (\text{Длина} \times \text{Ширина}^2) / 2;$$

Относительный объем опухоли (RTV) =  $TV_t / TV_0$ , где  $TV_0$  представляет собой объем опухоли во время введения после разделения по клеткам, и  $TV_t$  представляет собой объем опухоли при каждом измерении;

Относительная степень пролиферации опухоли T/C (%) =  $(T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$ , где  $T_{RTV}$  представляет собой RTV группы лечения, и  $C_{RTV}$  представляет собой RTV контрольной группы холостого раствора;

$$\text{Ингибирование роста опухоли (TGI)} = (1 - T/C) \times 100\%.$$

Экспериментальные результаты показаны на фиг. 17. По сравнению с модельной группой, группа лекарственного средства антитела PC1 может значительно ингибировать рост подкожной ксенотрансплантатной опухоли NCI-H929 множественной миеломы человека. Ингибирование роста опухоли антителом PC1 на 8, 11, 14 и 17 дни составляет 84,4%, 90,9%, 94,2% и 95,5%, соответственно.

**Пример 19. Фармакокинетика однократной внутривенной инъекции мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 яванским макакам**

Однократную внутривенную инфузию PC1 проводили яванским макакам (№ 1M01-1M03 и 2M01-2M03, по 3 на группу дозы, самцы, масса тела: 2-3 кг). Мультиспецифическое антитело PC1 вводили в дозе 1 или 9 мг/кг, и время внутривенного капельного введения составляло 30 мин. Образцы крови собирали в каждый момент времени до и после введения и центрифугировали при 4000 об/мин в течение около 10

мин (2-8 °C) в течение 1 часа для разделения сывороток, и концентрации лекарственного средства в образцах крови в каждый момент времени измеряли с помощью ELISA. Время отбора образцов: 0 ч (до введения) и 0,5 ч, 4 ч, 24 ч, 48 ч, 96 ч, 168 ч, 240 ч и 336 ч после введения.

Параметры были следующими:

$C_{\text{макс}}$ : максимальная наблюдаемая концентрация препарата

AUC: площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени

$T_{1/2}$ : период полувыведения

Cl - клиренс

MRT: Среднее время удержания

Экспериментальные результаты показывают, что при введении 1 мг/кг и 9 мг/кг мультиспецифических антител к ВСМА/к CD3 путем однократной внутривенной инфузии конечный период полувыведения лекарственного средства  $t_{1/2}$  составляет 105 и 112 ч, соответственно,  $C_{\text{макс}}$  составляет 19 и 200 мкг/мл, соответственно,  $AUC_{\text{last}}$  (AUC от момента введения до последней измеренной концентрации) составляет 700 и 7200 ч\*мкг/мл, соответственно, и количество воздействия продукта в сыворотке существенно увеличивается пропорционально дозе.

Таблица 17. Основные средние фармакокинетические параметры инъекции PC1 после однократной внутривенной инъекции 1 и 9 мг/кг яванским макакам

Группа	$C_{\text{макс}}$ (мкг/мл)	$AUC_{\text{last}}$ (ч*мкг/мл)	$t_{1/2}$ (ч)	Cl (мл/ч/кг)	$MRT_{\text{last}}$ (MRT от момента введения до последней измеренной концентрации) (ч)
1 мг/кг	19	700	105	1,417	70
9 мг/кг	200	7200	112	1,174	66

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

(ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антигеном; и

(iii) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном;

где первый антиген представляет собой ВСМА (антиген созревания В-клеток) и второй антиген представляет собой активирующий Т-клеточный антиген, и первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент оба являются одиночными вариабельными доменами и каждый независимо содержит любую из:

(b) CDR1 (определяющая комплементарность область 1), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15;

(a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

или

(d) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

2. Мультиспецифическое антитело по п. 1, где каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и третьего антигенсвязывающего фрагмента независимо содержит любое из:

(b) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; или

(c) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

3. Мультиспецифическое антитело по п. 2, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

4. Мультиспецифическое антитело по п. 2, где третий антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и первый антигенсвязывающий фрагмент содержит следующие определяющие комплементарность области: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

5. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, 37 или 38, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,



98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, 39 или 40; или

первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39.

6. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, где

первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, 39 или 40, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, 37 или 38; или

первый антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39, и третий антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37.

7. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-6, где первый антигенсвязывающий фрагмент и третий антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из:

(1) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(2) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(3) первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и третьего антигенсвязывающего

фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(4) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(5) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(6) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 39 или 40;

(7) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42;

(8) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41;

(9) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39; или

(10) третьего антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

8. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-7, где активирующий T-клеточный антиген представляет собой CD3.

9. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит следующие определяющие комплементарности области: HCDR1 (CDR1 тяжелой

цепи), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; переменная область легкой цепи содержит LCDR1 (CDR1 легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48; или

переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 49, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, HCDR2 и LCDR3 переменной области, представленной в SEQ ID NO: 50.

10. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-9, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50.

11. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащее

(iv) Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов.

12. Мультиспецифическое антитело по п. 11, где

(1) второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента;

(2) второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ScFv, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом

другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом второго антигенсвязывающего фрагмента;

(3) второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом первого антигенсвязывающего фрагмента или

(4) второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом одного Fc-полипептида Fc-домена, второй антигенсвязывающий фрагмент на С-конце своего Fab тяжелой цепи слит с N-концом другого Fc-полипептида Fc-домена, и третий антигенсвязывающий фрагмент на своем С-конце слит с N-концом Fab легкой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента или N-концом Fab тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента.

13. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 11-12, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, Fc-домен IgG человека или Fc-домен IgG1 или IgG4 человека;

необязательно, Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая способствует ассоциации двух Fc-полипептидов Fc-домена; или/и

Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с рецептором Fc и/или эффекторную функцию Fc-домена; или/и

Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая уменьшает или устраняет связывание СНЗ-области одного Fc-полипептида в Fc-домене с белком А.

14. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-13, где мультиспецифическое антитело состоит из:

(1) двух полипептидных цепей, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67;

(2) двух полипептидных цепей, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 71;

(3) трех полипептидных цепей, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 63;

(4) трех полипептидных цепей, причем одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 73, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75;

(5) двух полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67;

(6) двух полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69, и другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71;

(7) трех полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63; или

(8) трех полипептидных цепей, где одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, другая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и еще одна полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ лечения заболевания, связанного с экспрессией ВСМА у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по любому из пп. 1-14 или фармацевтической композиции по п. 15, где заболевание представляет собой лимфому, множественную миелому, лейкоз, системную красную волчанку или ревматоидный артрит.

17. ВСМА-связывающее антитело, содержащее одиночный вариабельный домен, где одиночный вариабельный домен содержит:

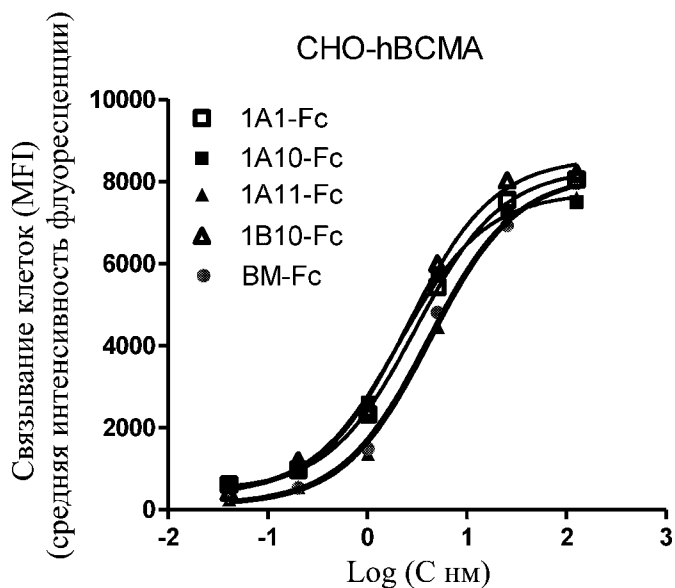
(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15;

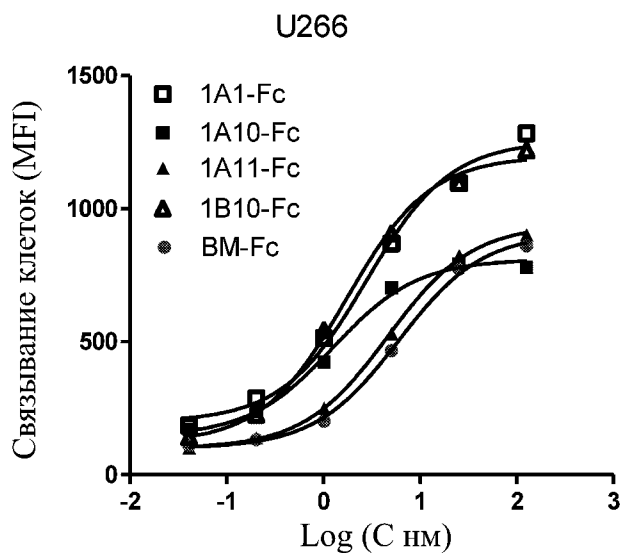
(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9

или

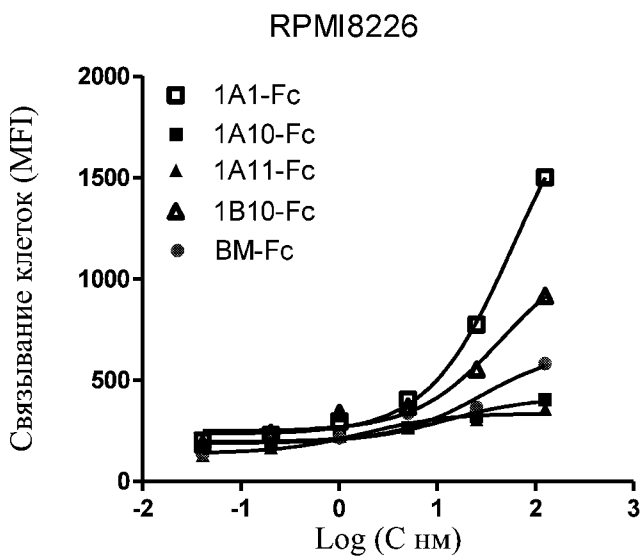
(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.



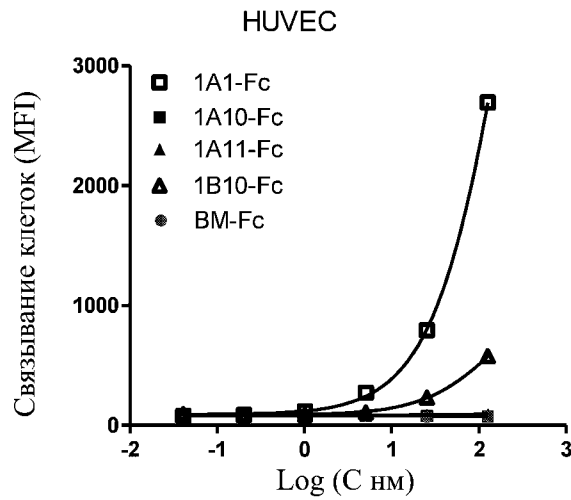
Фиг. 1А



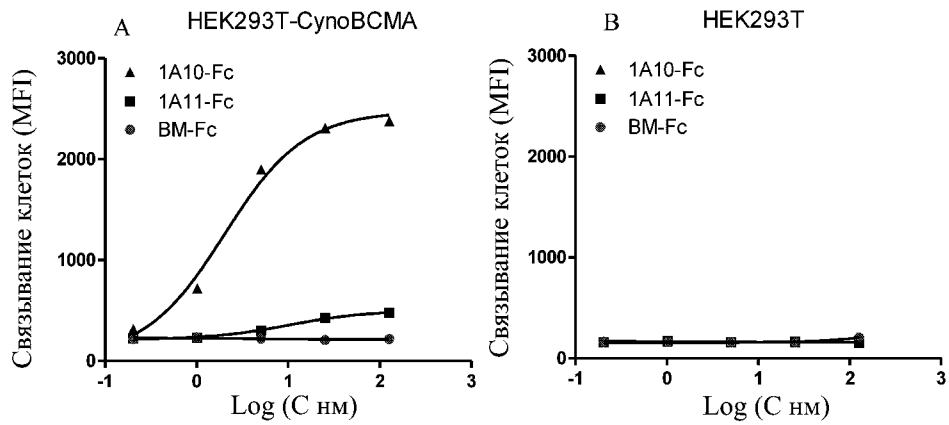
Фиг. 1В



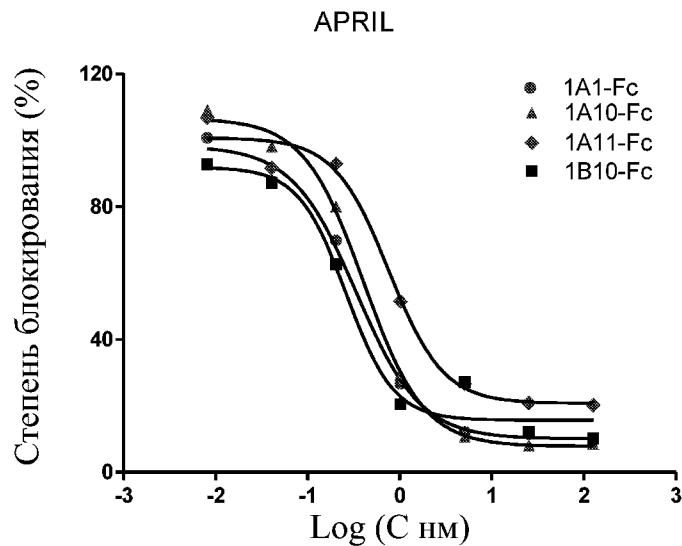
Фиг. 1С



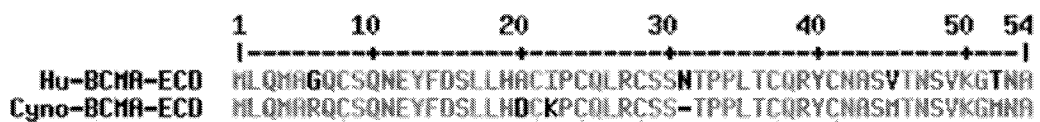
Фиг. 1D



Фиг. 2

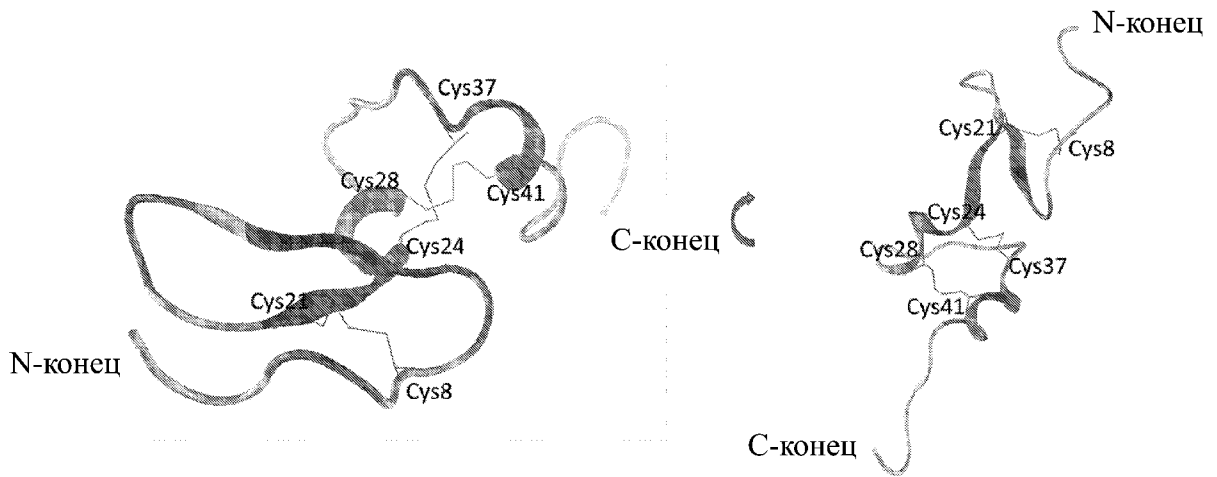


Фиг. 3

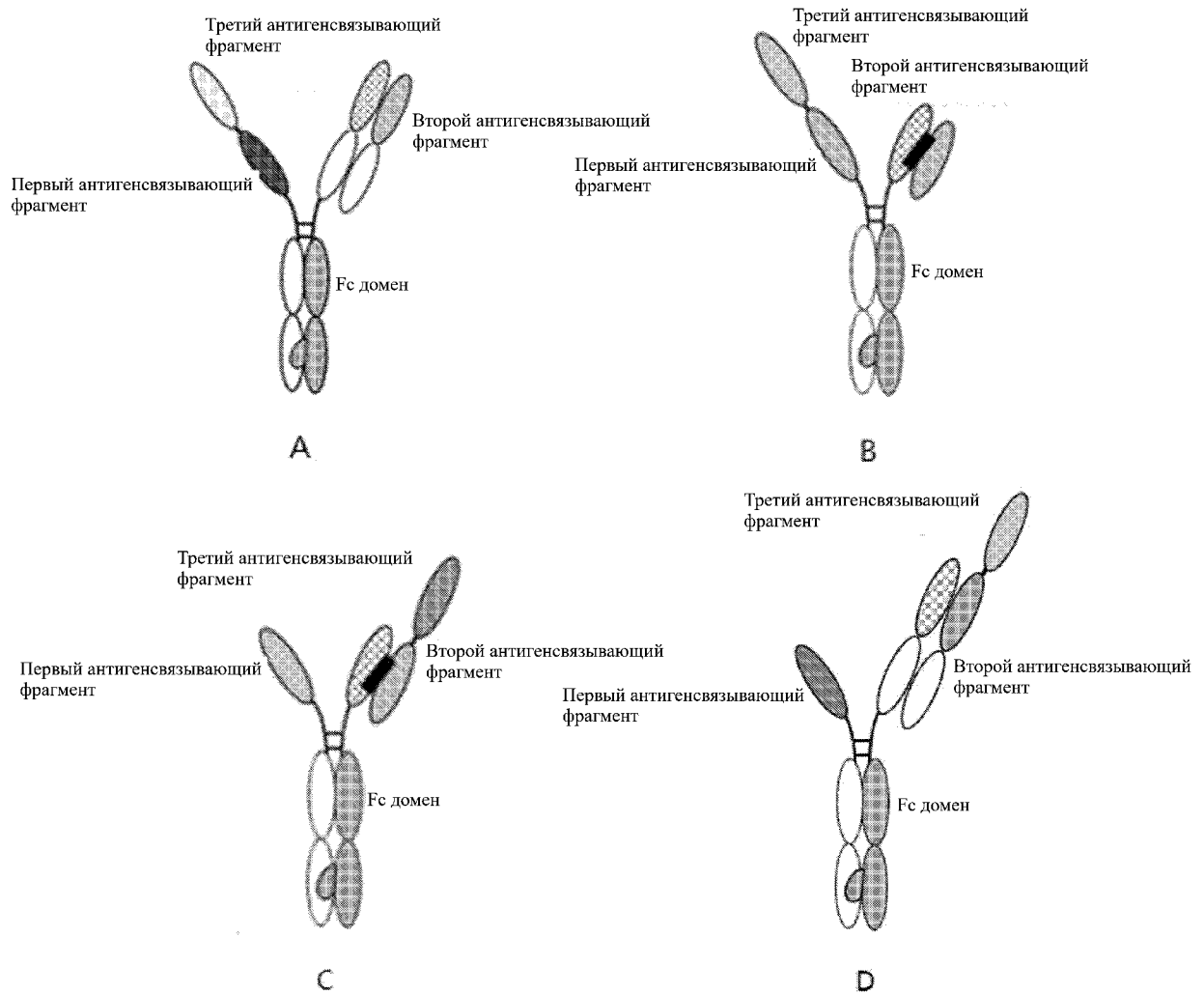


Фиг. 4A

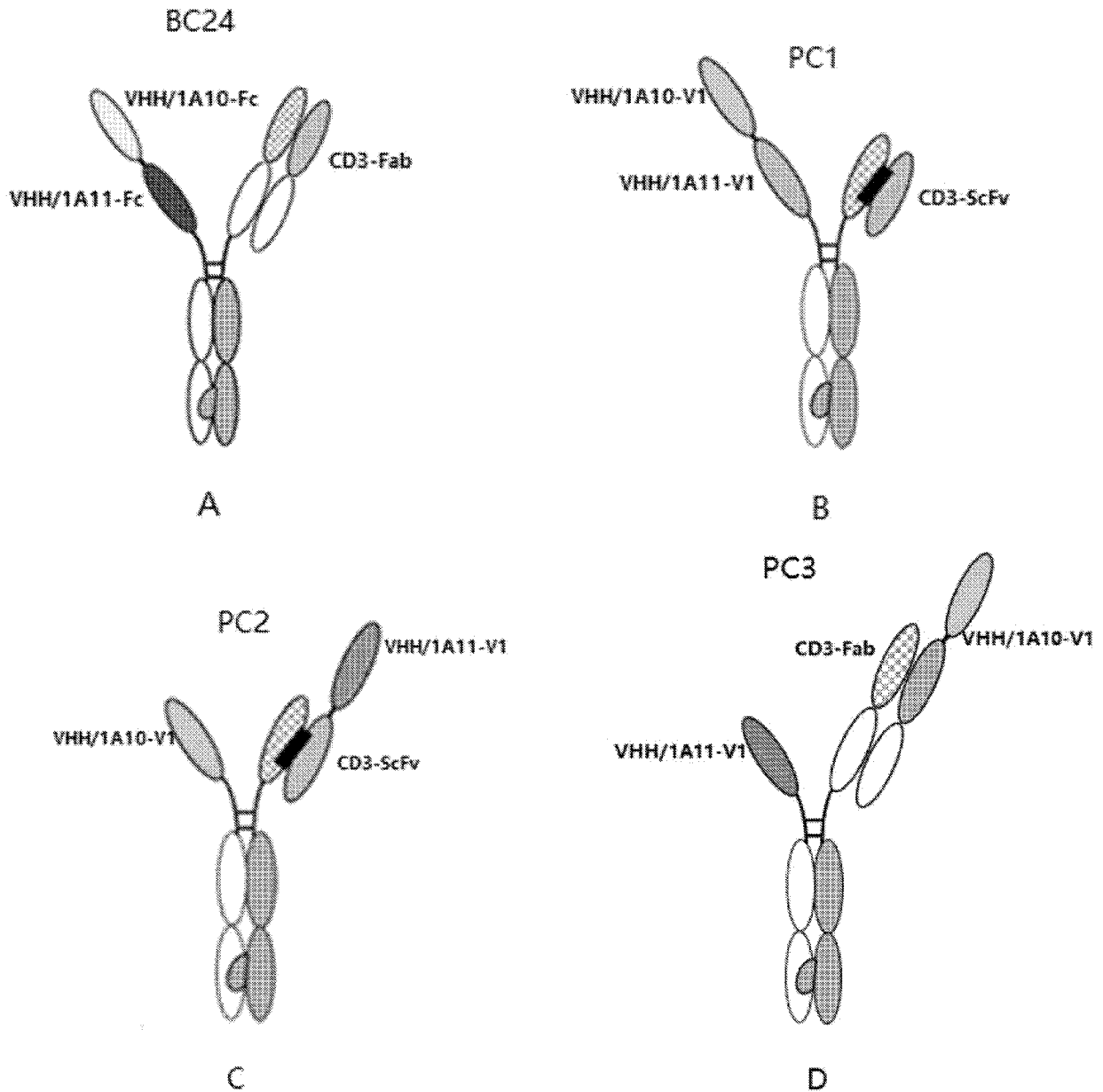




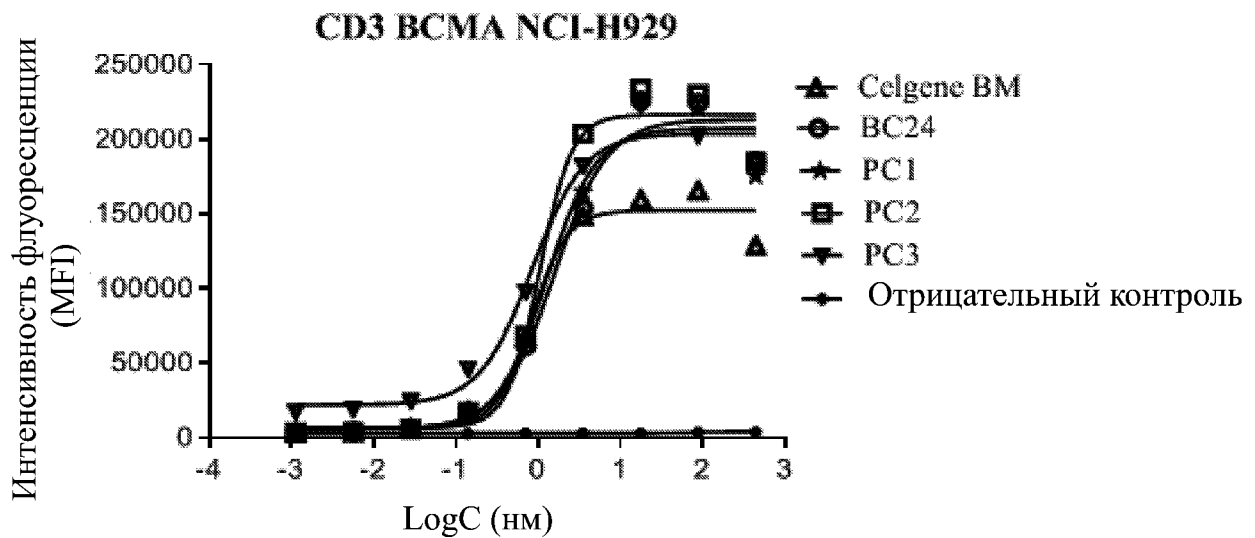
Фиг. 4В



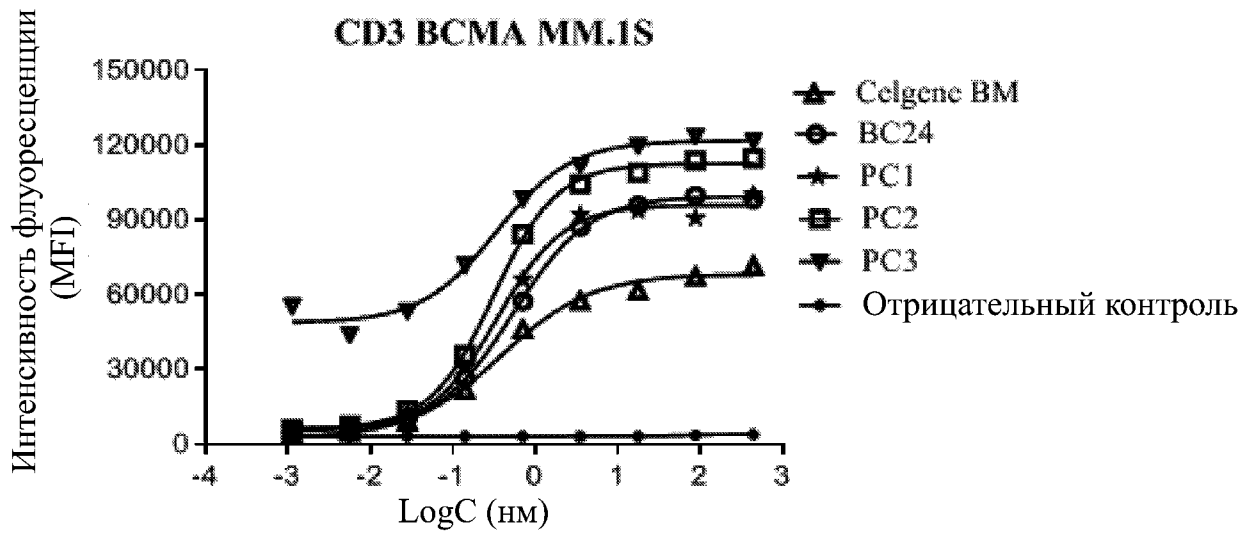
Фиг. 5



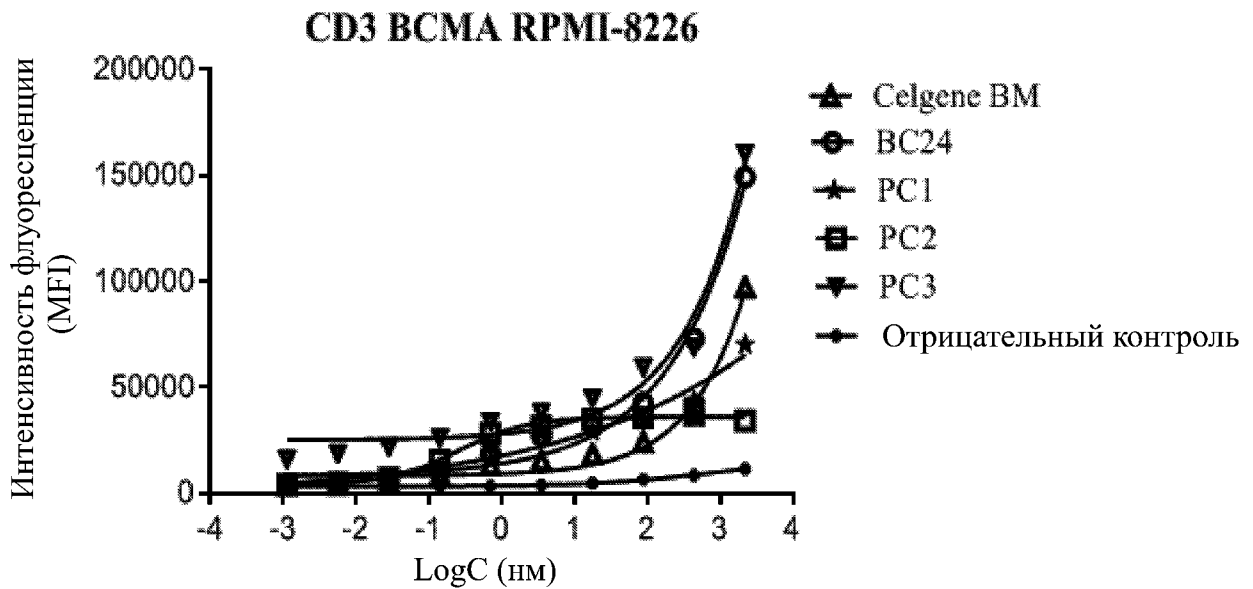
Фиг. 6



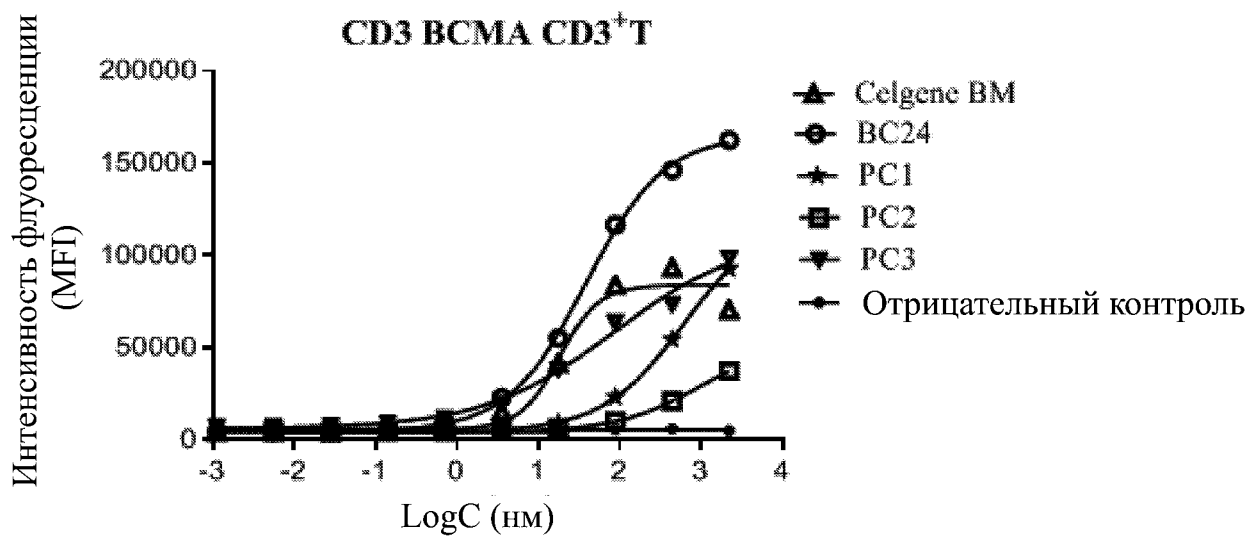
Фиг. 7



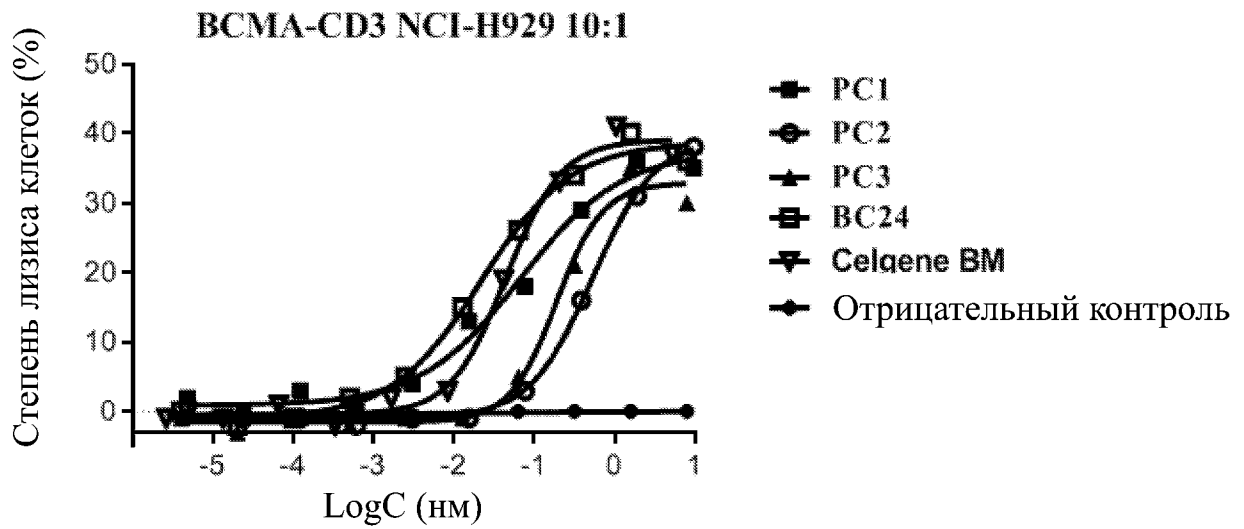
Фиг. 8



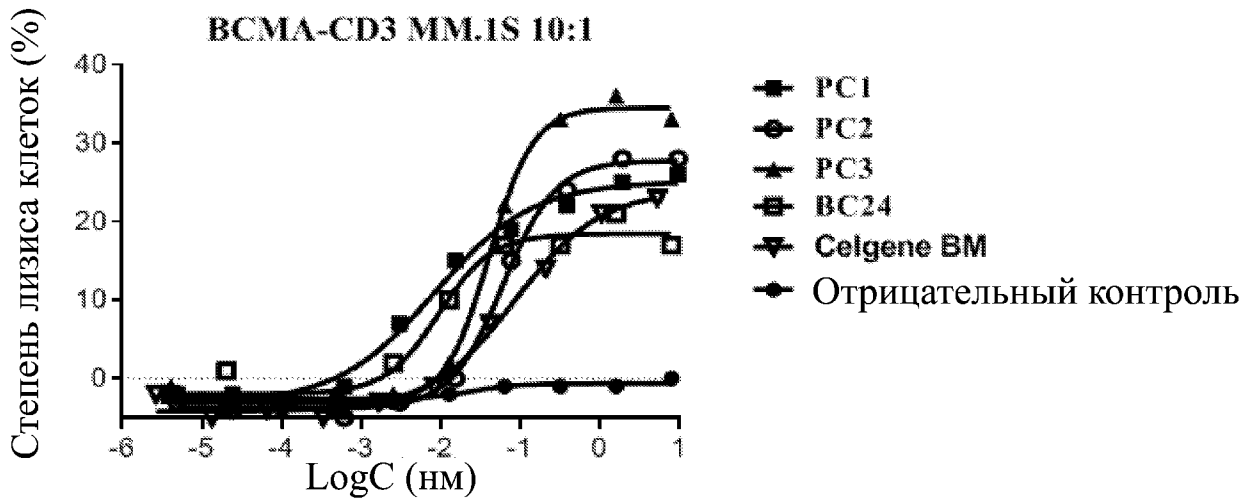
Фиг. 9



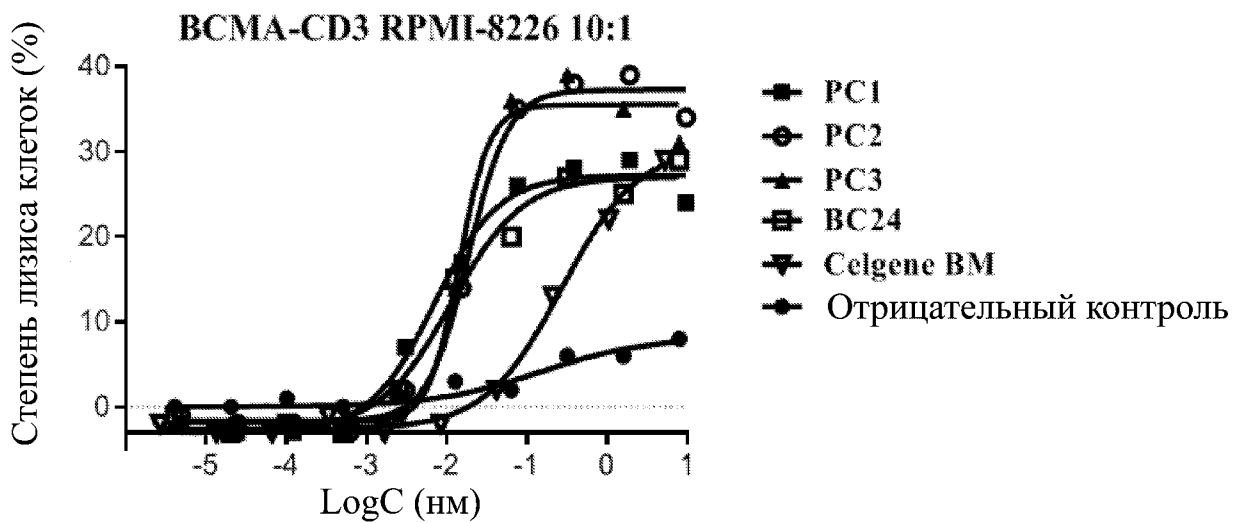
Фиг. 10



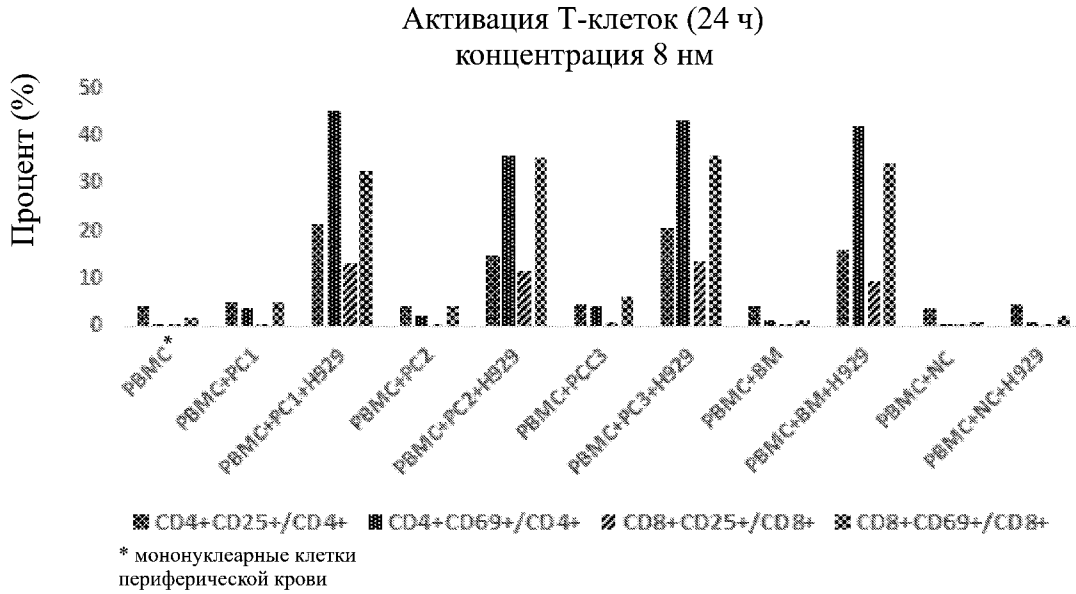
Фиг. 11



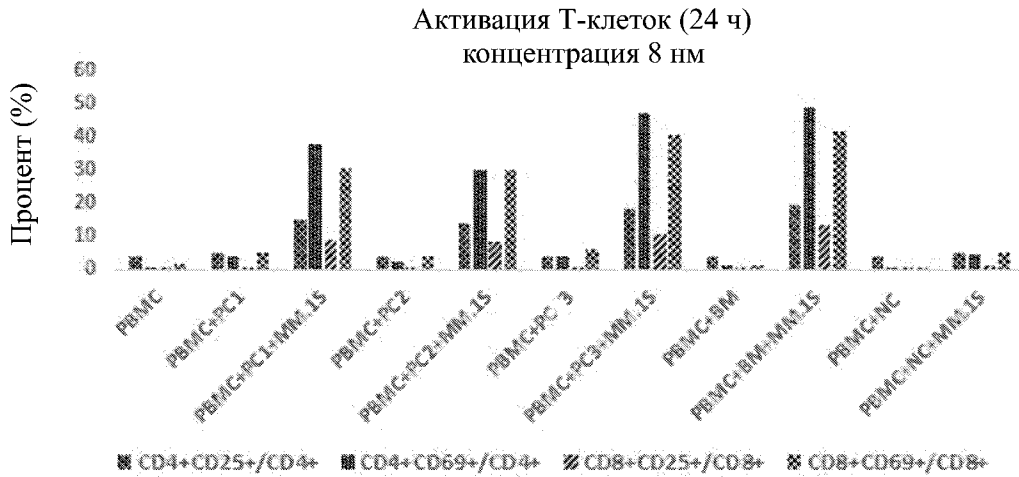
Фиг. 12



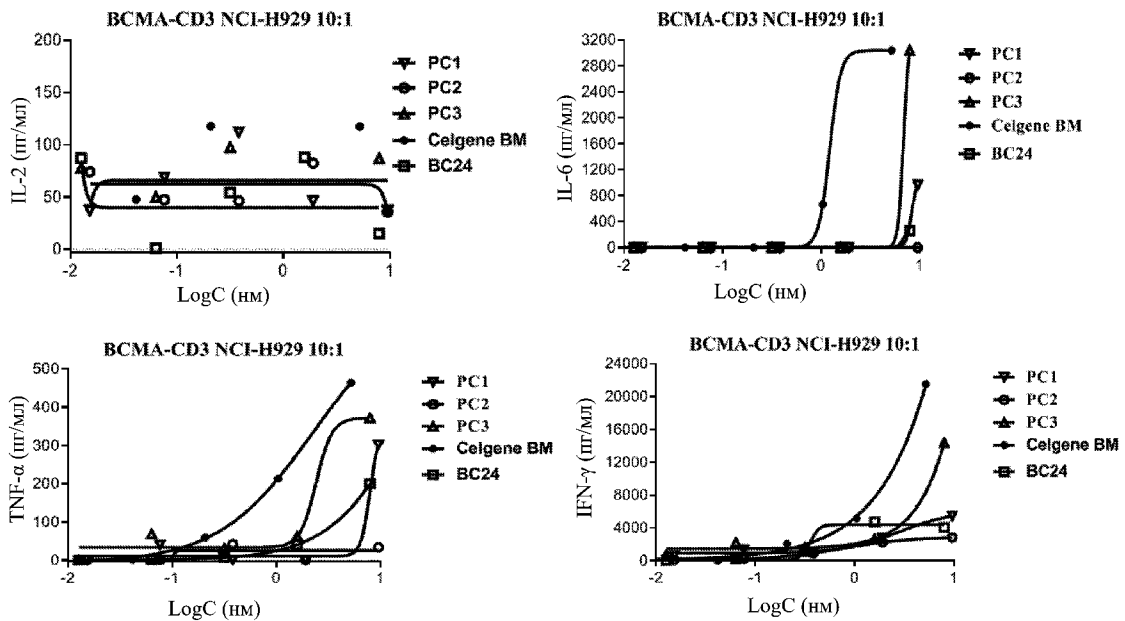
Фиг. 13



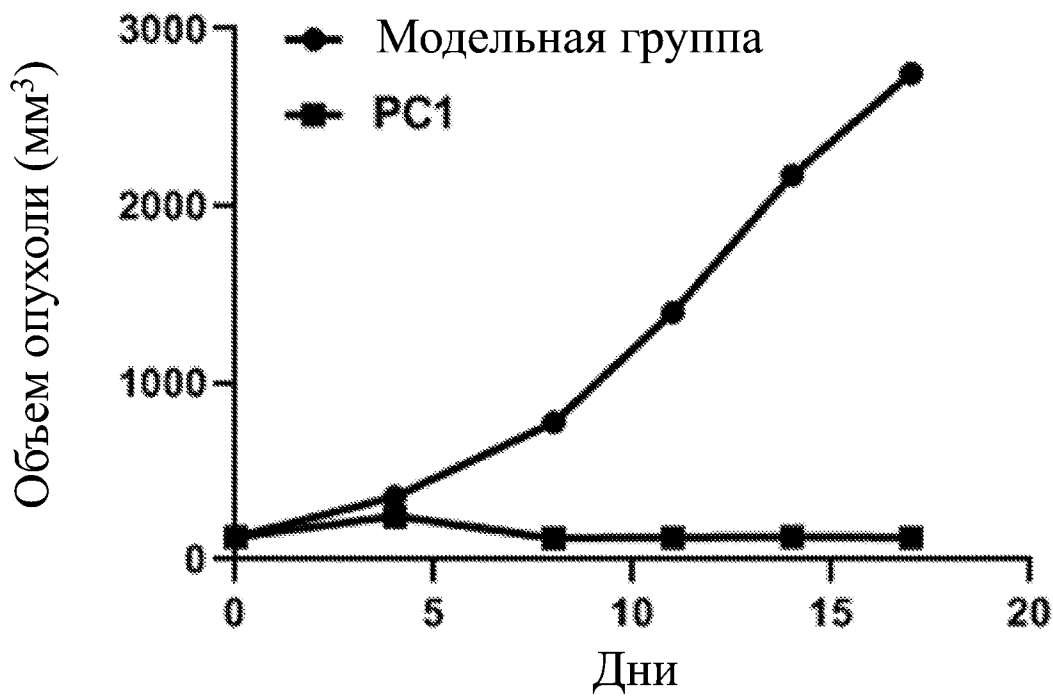
Фиг. 14



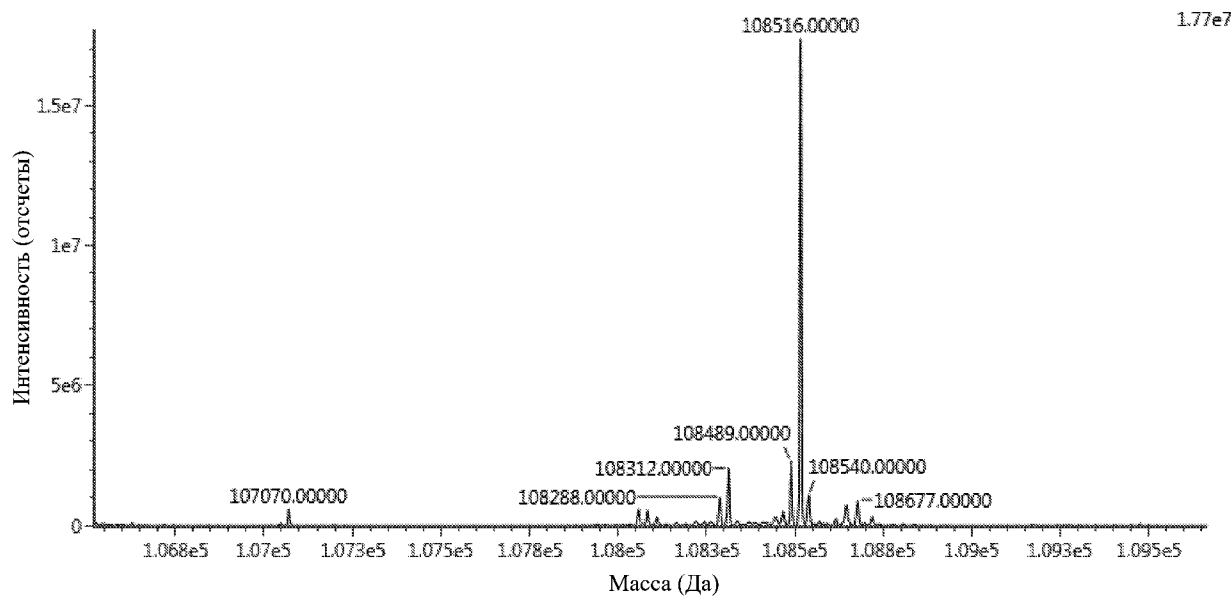
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18