

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391293** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.05

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.09

(54) **АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОЧНЫЕ
РЕЦЕПТОРЫ**

(31) 20213166.0

(32) 2020.12.10

(33) EP

(86) PCT/EP2021/085079

(87) WO 2022/122973 2022.06.16

(71) Заявитель:

ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Паррен Пол Уиллем Генри Ида,
Руверс Робертус Корнелис, Ван Дер
Влит Йоханнес Йелле, Лютье Хюлсик
Давид, Махилсен Петер Александер
Герардус Мариа, Ван Вестерховен
Михил, Кинг Лиза Анна, Феннеманн
Феликс-Леннарт (NL)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, способным связывать Т-клеточный рецептор Vγ9Vδ2 человека. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по настоящему изобретению и к способам применения антител по настоящему изобретению для медицинского лечения.

A1

202391293

202391293

A1

Антитела, которые связывают гамма-дельта Т-клеточные рецепторы

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к новым антителам, способным связывать цепь V δ 2 Т-клеточного рецептора V γ 9V δ 2 человека. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по настоящему изобретению и к способам применения антител по настоящему изобретению для медицинского лечения.

Предпосылки изобретения

Гамма-дельта- ($\gamma\delta$) Т-клетки представляют собой Т-клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), который состоит из гамма-цепи и дельта-цепи. Большинство $\gamma\delta$ -Т-клеток экспрессируют TCR, содержащие области V γ 9 и V δ 2. Т-клетки V γ 9V δ 2 могут реагировать против широкого спектра патогенов и опухолевых клеток. Считается, что эта широкая реактивность обеспечивается фосфоантигенами, которые способны специфически активировать эту субпопуляцию Т-клеток зависимым от TCR образом. Широкая противомикробная и противоопухолевая реактивность Т-клеток V γ 9V δ 2 свидетельствует о прямом участии в иммунном контроле форм рака и инфекций.

Средства, которые активируют Т-клетки V γ 9V δ 2, могут быть применимыми в лечении инфекций и рака, поскольку они могут способствовать V γ 9V δ 2 Т-клеточной реактивности по отношению к патогену или инфицированным клеткам или раковой клетке. В WO2015156673 описаны антитела, которые связывают TCR V γ 9V δ 2 и способны активировать Т-клетки V γ 9V δ 2. В WO2020060405 описаны биспецифические антитела, которые связывают как Т-клетки V γ 9V δ 2, так и опухолевую клетку-мишень и, таким образом, характеризуются потенциалом привлекать Т-клетки V γ 9V δ 2 к опухоли и, таким образом, стимулировать терапевтический эффект.

Рекомбинантное получение антител в клетка-хозяевах часто приводит к образованию гетерогенных продуктов, содержащих различные формы антитела с различными типами и степенями посттрансляционных модификаций полипептидной цепи. Такая гетерогенность является нежелательной для продукта антитела для медицинского применения, поскольку посттрансляционные модификации могут изменять функциональные свойства антител, например, с точки зрения аффинности антигена-мишени, с точки зрения фармакокинетических свойств, стабильности продукта, агрегации и т. д.

В настоящем изобретении предусмотрены улучшенные последовательности антитела, связывающего TCR V γ 9V δ 2, что приводит к образованию более гомогенного

продукта при получении в клетке-хозяине, еще сохранению функциональных свойств в отношении связывания с мишенью и функциональных эффектов в отношении клеток-мишеней, а также хороших структурных свойств, таких как стабильность.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что антитело 5C8, описанное в WO2015156673, подвергается сульфатированию в месте антитела, которое, как предполагалось, не подвергается этой посттрансляционной модификации. Сульфатирование происходило частично в различных клетка-хозяевах, что приводило к образованию гетерогенного продукта антитела.

Неожиданно, тирозиновый остаток, приводящий к сульфатированию, можно подвергать мутации по типу замены на фенилаланин или серин без влияния на антигенсвязывающие свойства антитела, даже если аминокислота расположена в области CDR3, которая, как известно, является главной детерминантой антигенсвязывающей специфичности в антигенсвязывающей области антитела.

Удаление сайта сульфатирования посредством мутации приводило к образованию более гомогенного продукта антитела.

Соответственно, в первом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать человеческую V δ 2, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены биспецифические антитела, содержащие первую связывающую область, способную связываться с человеческой V δ 2, как определено в данном документе, и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, где второй антиген предпочтительно представляет собой человеческий EGFR. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по настоящему изобретению, способам применения антител по настоящему изобретению в медицинском лечении и к конструкциям нуклеиновой кислоты, векторам экспрессии для получения антител по настоящему изобретению и к клеткам-хозяевам, содержащим такие конструкции нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения антител по настоящему

изобретению, которые позволяют избежать сульфатирования и обеспечивают более гомогенные продукты.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления по настоящему изобретению описаны ниже.

Краткое описание графических материалов

Фигура 1. Иллюстративная хроматограмма профиля разделения по размеру соединения LAVA, очищенного с помощью белка А (показано VHH 5C8), с применением колонки Superdex-75. Фракции доминантного мономерного пика (фракции 1E11-1G2) объединяли и количественно определяли.

Фигура 2. Иллюстративный пример электрофореза в полиакриламидном геле labchip очищенного VHH 5C8. Слева: невозстанавливающие, справа: восстанавливающие условия.

Фигура 3. Профили HP-SEC очищенного VHH 5C8 (A) и VHH 5C8var1 (B).

Фигура 4. Иллюстративные профили HP-SEC очищенного биспецифического VHH (bsVHH) 1D12var5-5C8var1. А: серия bsVHH 1D12var5-5C8var1, которая экспрессировалась и была очищена с помощью аффинной хроматографии на основе белка А из надосадочной жидкости *Pichia pastoris*. В: серия bsVHH 1D12var5-5C8var1, которая экспрессировалась и была очищена с помощью как хроматографии на основе белка А, так и эксклюзионной хроматографии из клеток НЕК-293 Е.

Фигура 5. Анализ Labchip очищенного VHH 5C8var1-Y105F и 5C8var1-Y105S в невозстанавливающих условиях.

Фигура 6. Анализ HP-SEC VHH 5C8var1-Y105F (A) и 5C8var1-Y105S (B).

Фигура 7. Измерения аффинности фрагмента VHH, связывающегося с рекомбинантным белком V γ 9V δ 2-TCR с применением BLI. Массу белка (ответ, в нм) наносят на график как функцию времени. Пунктирная вертикальная линия отделяет фазу ассоциации (слева) от фазы диссоциации (справа). А: VHH 5C8var1; В: VHH 5C8var1-Y105F; С: VHH 5C8var1-Y105S. Прямые черные линии представляют собой подогнанные данные к фактически измеренным ответам.

Фигура 8. Как bsVHH 7D12var8-5C8var1-Y105F, так и bsVHH 7D12-5C8 индуцируют сильную V γ 9V δ 2 Т-клеточную активацию и вызывают опосредованный Т-клетками V γ 9V δ 2 лизис опухолевых клеток. А: 4-часовой анализ дегрануляции: процент CD107A (LAMP-1)+ Т-клеток V γ 9V δ 2 наносят на график как функцию применяемой концентрации антитела. Слева: 7D12-5C8 (негуманизированное); справа: 7D12var8-5C8var1-Y105F. В: 24-часовой

анализ цитотоксичности, демонстрирующий процент уничтожения опухолевых клеток A431 как функцию применяемой концентрации антитела. Слева: 7D12-5C8 (негуманизованное); справа: 7D12var8-5C8var1-Y105F.

Фигура 9. Связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с первичными $\gamma\delta$ Т-клетками, выделенными из РВМС здоровых людей, с применением проточной цитометрии. На двух панелях представлены два различных донора.

Фигура 10. Связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с EGFR на опухолевых клетках посредством клеточного ELISA.

Фигура 11. Дегрануляция $\gamma\delta$ Т-клеток, индуцированная 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc, зависимым от линии клеток A431.

Фигура 12. Жизнеспособность клеток A-388 в совместной культуре с $\gamma\delta$ Т-клетками и 7D12-5C8.

Фигура 13. Лизированные опухолевые клетки после 4-часового культивирования суспензий диссоциированных опухолевых клеток (первичный CRC: n=10, CRC с метастазами брюшины: n=5, CRC с метастазами печени: n=3, первичный HNSCC: n=5 и первичный NSCLC: n=4) с Т-клетками V γ 9V δ 2, полученными от здорового донора (соотношение E:T, составляющее 1:1) и 7D12-5C8 (50 нМ) или контролем со средой.

Фигура 14. Лизированные опухолевые клетки после 24-часового культивирования суспензий диссоциированных опухолевых клеток (CRC с метастазами брюшины: n=4) с Т-клетками V γ 9V δ 2, полученными от здорового донора (соотношение E:T, составляющее 1:1) и 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc (50 нМ), gp120-5C8var1(Y105S)-Fc (50 нМ) или контролем со средой.

Фигура 15. Структура конструкции для исследований на приматах, отличных от человека.

Фигура 16. Связывание 7A5-7D12var8-Fc с мишенями антигенов.

Фигура 17. Дегрануляция и цитотоксичность, опосредованные 7A5-7D12var8-Fc.

Фигура 18. Анализы РК концентраций 7A5-7D12var8-Fc в крови трех обработанных животных. Показаны кривые зависимости концентрации от времени, которые демонстрируют молекулу, характеризующуюся РК, подобной IgG.

Фигура 19. Общее количество Т-клеток (CD3+, левый график) и количество V γ 9-положительных клеток (как процент популяции CD3+) в крови обработанных животных.

Стрелки указывают на инъекции соединения. Числа в легенде представляют собой числа обработанных обезьян.

Фигура 20. Уровни цитокина IL-6 в крови обработанных животных с течением времени. Наблюдали только низкие уровни цитокина и высвобождение в основном ограничивалось после первой инъекции. Указатели стрелок указывают на моменты обработки.

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

Используемый в данном документе термин «человеческая V δ 2» относится к перестроенной δ 2-цепи Т-клеточного рецептора (TCR) V γ 9V δ 2. В UniProtKB - A0JD36 (A0JD36_HUMAN) представлен пример варибельной последовательности TRDV2. V δ 2 представляет собой часть дельта-цепи V γ 9V δ 2-TCR. Антитело, способное связываться с человеческой V δ 2, может связывать эпитоп, полностью расположенный в варибельной области, или связывать эпитоп, расположенный в константной области, или связывать эпитоп, который представляет собой комбинацию остатков варибельных и константных областей дельта-цепи.

Используемый в данном документе термин «человеческая V γ 9» относится к перестроенной γ 9-цепи Т-клеточного рецептора (TCR) V γ 9V δ 2. В UniProtKB – Q99603_HUMAN представлен пример варибельной последовательности TRGV9.

Используемый в данном документе термин «EGFR» относится к белку человеческого EGFR (UniProtKB - P00533 (EGFR_HUMAN)).

Термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, фрагмента молекулы иммуноглобулина или производного любого из них, которые характеризуются способностью специфически связываться с антигеном в обычных физиологических условиях с периодом полужизни, составляющим значительные периоды времени, таким как по меньшей мере приблизительно 30 минут, по меньшей мере приблизительно 45 минут, по меньшей мере приблизительно один час, по меньшей мере приблизительно два часа, по меньшей мере приблизительно четыре часа, по меньшей мере приблизительно 8 часов, по меньшей мере приблизительно 12 часов, приблизительно 24 часа или больше, приблизительно 48 часов или больше, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д., или с любым другим соответствующим функционально определенным периодом (таким как время, достаточное для индуцирования, стимулирования, усиления

и/или модулирования физиологического ответа, ассоциированного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для того, чтобы антитело приобрело эффекторную активность). Антигенсвязывающая область (или антигенсвязывающий домен), которые взаимодействуют с антигеном, могут включать переменные области как тяжелых, так и легких цепей молекулы иммуноглобулина или могут представлять собой однодоменную антигенсвязывающую область, например, только тяжелую цепь переменной области. Константные области антитела, если они присутствуют, могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки или Т-клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента.

Fc-область иммуноглобулина определена как фрагмент антитела, который, как правило, получают после расщепления антитела папапином, которое включает две области CH2-CH3 иммуноглобулина и соединительной области, например, шарнирной области. Константный домен тяжелой цепи антитела определяет изотип антитела, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD или IgE. Fc-область опосредует эффекторные функции антител с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами и белками системы комплемента.

Используемый в данном документе термин «шарнирная область» предназначен для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, шарнирная область антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 216-230 в соответствии с EU-нумерацией.

Используемые в данном документе термины «область CH2» или «домен CH2» предназначены для обозначения области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область CH2 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340 в соответствии с EU-нумерацией. Однако область CH2 также может представлять собой область любого из других подтипов, описанных в данном документе.

Используемые в данном документе термины «область CH3» или «домен CH3» предназначены для обозначения области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область CH3 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 в соответствии с EU-нумерацией. Однако область CH3 также может представлять собой область любого из других подтипов, описанных в данном документе.

Ссылка на аминокислотные положения в Fc-области/Fc-домене в настоящем изобретении соответствует EU-нумерации (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Как указано выше, используемый в данном документе термин «антитело», если не указано иное или это явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином «антитело», включают (i) Fab'- или Fab-фрагмент, т. е. моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, описанное в WO2007059782; (ii) F(ab')₂-фрагменты, т. е. бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, по сути содержащий домены VH и CH1; и (iv) Fv-фрагмент, по сути содержащий домены VL и VH одного плеча антитела. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который обеспечивает возможность сделать их одной белковой цепью, в которой области VL и VH образуют пары с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (sFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином «антитело», если в контексте не указано иное. Хотя такие фрагменты обычно включены в значение антитела, они вместе и каждый независимо являются уникальными признаками по настоящему изобретению, демонстрирующими биологические свойства и полезность. Термин «антитело», если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), химерные антитела и гуманизированные антитела и фрагменты антител, полученные с помощью любой известной методики, такой как ферментативное расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные методики.

В некоторых вариантах осуществления антител по настоящему изобретению первая антигенсвязывающая область, или вторая антигенсвязывающая область, или обе представляют собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела являются хорошо известными специалисту в данной области техники, см., например, Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446, Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327 и Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21. Однодоменные антитела содержат одну CDR1, одну

CDR2 и одну CDR3. Примеры однодоменных антител представляют собой переменные фрагменты антител, содержащих только тяжелую цепь, антител, которые в природе не содержат легкие цепи, однодоменных антител, полученных из стандартных антител, и сконструированных антител. Однодоменные антитела можно получать от любых видов, в том числе мыши, человека, верблюда, ламы, акулы, козы, кролика и коровы. Например, однодоменные антитела можно получать из антител, выращенных в видах Camelidae, например, в верблюде, дромадере, ламе, альпаке и гуанако. Как и целое антитело, однодоменное антитело способно селективно связываться со специфическим антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только переменный домен цепи иммуноглобулина, т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 и каркасные области. Такие антитела также называются Nanobody® или VHH.

Используемый в данном документе термин «иммуноглобулин» предназначен для обозначения класса структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, при этом все четыре потенциально взаимосвязаны дисульфидными связями. Используемые в данном документе термины «тяжелая цепь иммуноглобулина» или «тяжелая цепь» предназначены для обозначения одной из цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь, как правило, содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно названную в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи (сокращенно названную в данном документе как CH), которые определяют изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи, как правило, содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Константная область тяжелой цепи дополнительно содержит шарнирную область. В структуре иммуноглобулина (например, IgG) две тяжелые цепи взаимосвязаны дисульфидными связями в шарнирной области. Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь, как правило, содержит несколько областей: переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL). Кроме того, области VH и VL можно подразделять на области гипервариабельности (или области гипервариабельности, которые могут являться гипервариабельными в последовательности и/или образовывать структурно определенные петли), также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Последовательности CDR можно определять путем применения различных способов, например, способов, представленных Chothia and Lesk (1987) J. Mol.

Biol. 196:901 или Kabat et al. (1991) Sequence of protein of immunological interest, fifth edition. NIH publication. Различные способы для определения CDR и нумерации аминокислот можно сравнить на www.abysis.org (UCL).

Используемый в данном документе термин «изотип» относится к иммуноглобулину (под)класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любому его аллотипу, такому как IgG1m(za) и IgG1m(f), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать либо с каппа- (κ), либо лямбда- (λ) легкой цепью. Антитело по настоящему изобретению может характеризоваться любым изотипом.

Термин «исходное антитело» следует понимать как антитело, которое является идентичным антителу в соответствии с настоящим изобретением, но где исходное антитело не характеризуется одной или несколькими конкретными мутациями. Термины «вариант», «вариант антитела» или «вариант исходного антитела» по настоящему изобретению означают молекулу антитела, которая включает одну или более мутаций по сравнению с «исходным антителом». Аминокислотные замены могут заменять нативную аминокислоту на другую встречающуюся в природе аминокислоту или на не встречающуюся в природе производное аминокислоты. Аминокислотная замена может являться консервативной или неконсервативной. В контексте настоящего изобретения консервативные замены можно определить посредством замен в классах аминокислот, отраженных в одной или нескольких из следующих трех таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислотные остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и

Альтернативные консервативные классы замен аминокислотных остатков

1	A	S	T
2	D	E	

3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Связанные с циклоалкенилом остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень малые остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании поворота	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, N, D, E и R

В контексте настоящего изобретения замена в варианте указана следующим образом:

исходная аминокислота – положение – замещенная аминокислота.

Применяют трехбуквенный код или однобуквенный код, в том числе коды Хаа и Х для обозначения аминокислотного остатка. Соответственно, обозначение «Т366W» означает, что вариант характеризуется заменой треонина на триптофан в варианте аминокислотного положения, соответствующего аминокислоте в положении 366 в исходном антителе.

Кроме того, термин «замена» включает замену в любой из других девятнадцати природных аминокислот или в других аминокислотах, таких как неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты Т в положении 366 включает каждую из следующих замен: 366А, 366С, 366D, 366G, 366H, 366F, 366I, 366K, 366L, 366M, 366N, 366P, 366Q, 366R, 366S, 366E, 366V, 366W и 366Y.

Используемый в данном документе термин «полноразмерное антитело» относится к антителу, которое содержит константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей, соответствующие тем, которые обычно обнаруживают в антителе дикого типа такого изотипа.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, где переменную область получают от видов, отличных от человека (например, получают от грызунов), и константную область получают от различных видов, таких как человек. Химерные антитела можно получить путем генетического конструирования. Химерные моноклональные антитела для способов терапевтического применения разрабатывают для снижения иммуногенности антитела.

Термин «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному антителу, не являющемуся человеческим, которое содержит человеческие константные домены антитела и переменные домены, не являющиеся человеческими, модифицированные для обеспечения высокого уровня гомологии последовательности с человеческими переменными доменами. Это можно достичь с помощью пересадки шести определяющих комплементарность областей (CDR) антител, не являющихся человеческими, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR). Чтобы полностью восстановить аффинность и специфичность связывания исходного антитела может потребоваться замена остатков каркаса из исходного антитела (т. е. антитела, не являющегося человеческим) человеческими каркасными областями (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые являются важными для свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать последовательности CDR, не являющиеся человеческими, первичные человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более обратных мутаций в аминокислотную последовательность, не являющуюся человеческой, и необязательно полностью человеческие константные области. Необязательно дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно являются обратными мутациями, можно вводить для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как свойства аффинности и биохимические свойства. Гуманизацию терапевтических антител, не являющихся человеческими, проводят для минимизации ее иммуногенности у человека, тогда как такие гуманизированные антитела в то же время поддерживают специфичность и аффинность связывания антитела нечеловеческого происхождения.

Термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью к по меньшей мере двум различным, как, например, по меньшей мере трем, как правило неперекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут находиться на одних и тех же или на разных антигенах-мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут находиться на такой же клетке или на разных клетках или типах клеток. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело может предусматривать одно или более однодоменных антител.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью к двум различным, как правило неперекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут находиться на одних и тех же или разных мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут находиться на такой же клетке или на разных клетках или типах клеток. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело может предусматривать одно или два однодоменных антитела.

Примеры различных классов мультиспецифических, таких как биспецифические, антител включают без ограничения (i) подобные IgG молекулы с комплементарными доменами СНЗ для обеспечения гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные подобные IgG молекулы с двойным нацеливанием, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух различных антител; (iii) слитые молекулы IgG, где полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) слитые молекулы, содержащие Fc, где одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; (v) слитые молекулы, содержащие Fab, где различные Fab-фрагменты слиты вместе, слитые с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диатела и антитела, содержащие тяжелую цепь (например, доменные антитела, Nanobodies®), где различные одноцепочечные Fv-молекулы, или различные диатела, или различные антитела, содержащие тяжелую цепь (например, доменные антитела, Nanobodies®), слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем, слитыми с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями.

Примеры подобных IgG молекул с молекулами комплементарных доменов СНЗ включают без ограничения Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech), выступы-во-впадины (Genentech), CrossMAbs (Roche) и электростатически согласованные (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. *J. Biol. Chem.* 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine,

WO2010134666, WO2014081202), тело домена, сконструированного путем обмена между нитями (SEEDbody)(EMD Serono), Biclomics (Merus, WO2013157953), Fc Δ Adp (Regeneron), биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat), асимметричный каркас (Zymeworks/Merck), mAb-Fv (Xencor), бивалентные биспецифические антитела (Roche, WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab).

Примеры рекомбинантных подобных IgG молекул с двойным нацеливанием включают без ограничения (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis, WO2009058383), антитело «два в одном» (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614), перекрестно сшитые Mab (Институт рака Карманоса), mAb2 (F-Star), Zybodies™ (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), подходы с общей легкой цепью, κλ-тела (NovImmune, WO2012023053) и CovX-body® (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501–506).

Примеры слитых молекул IgG включают без ограничения двойной вариабельный домен (DVD)-Ig (Abbott), двухголовочные антитела с двойным доменом (Unilever; Sanofi Aventis), подобные IgG биспецифические антитела (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) и BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), HERCULES (Biogen Idec), слитый scFv (Novartis), слитый scFv (Changzhou Adam Biotech Inc) и TvAb (Roche).

Примеры слитых молекул, содержащих Fc, включают без ограничения слияния ScFv/Fc (Научное учреждение, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR, 100-ая ежегодная конференция, 2009 г. (реферат № 5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), технологию перенацеливания с двойной аффинностью (Fc-DARTTM) (MacroGenics) и двойной (ScFv)₂-Fab (Национальный научный исследовательский центр лечения с помощью антител – Китай).

Примеры слитых биспецифических антител, содержащих Fab, включают без ограничения F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), бивалентные биспецифические антитела (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech).

Примеры антител на основе ScFv и диатела и доменных антител включают без ограничения привлекающий T-клетки биспецифический активатор (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), технологию перенацеливания с двойной аффинностью (Fc-DARTTM) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic, Lawrence FEBS Lett.

1998 Apr 3;425(3):479-84), подобные TCR антитела (AIT, ReceptorLogics), слитый ScFv сывороточного альбумина человека (Merrimack, WO2010059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75), нанотела с двойным нацеливанием® (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010), доменные антитела с двойным нацеливанием, содержащие только тяжелую цепь.

В контексте антитела, связывающегося с антигеном, термины «связывает» или «специфически связывает» относятся к связыванию антитела с предварительно определенным антигеном или мишенью (например, человеческой Vδ2 или человеческим EGFR), с которыми, как правило, связывание происходит с кажущейся аффинностью, соответствующей K_D , составляющей приблизительно 10^{-6} М или меньше, например, 10^{-7} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-8} М или меньше, как, например, приблизительно 10^{-9} М или меньше, приблизительно 10^{-10} М или меньше или приблизительно 10^{-11} М или даже меньше, например, при определении с применением проточной цитометрии, как описано в примерах в данном документе. В качестве альтернативы значения K_D можно определять с применением, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в BIAcore T200 или биослойной интерферометрии (BLI) в приборе Octet RED96 с применением антигена в качестве лиганда и связывающего фрагмента или связывающей молекулы в качестве аналита. Специфическое связывание означает, что антитело связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая является в по меньшей мере десять раз ниже, как например, в по меньшей мере 100 раз ниже, например, в по меньшей мере 1000 раз ниже, как, например, в по меньшей мере 10000 раз ниже, например, в по меньшей мере 100000 раз ниже, чем его аффинность к связыванию с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близкородственного антигена. Степень снижения аффинности зависит от K_D связывающего фрагмента или связывающей молекулы, поэтому, когда K_D связывающего фрагмента или связывающей молекулы является очень низкой (то есть связывающий фрагмент или связывающая молекула являются высокоспецифичными), то разница в степени снижения аффинности к антигену по сравнению со степенью снижения аффинности к неспецифическому антигену может составлять по меньшей мере 10000 раз. Используемый в данном документе термин « K_D » (М) относится к константе равновесия при диссоциации конкретного взаимодействия между антигеном и связывающим фрагментом или связывающей молекулой.

В контексте настоящего изобретения термины «конкуренция», или «способность конкурировать», или «конкурирует» относятся к любому выявляемому значительному

снижению склонности конкретной связывающей молекулы (например, антитела EGFR) связывать конкретного партнера для связывания (например, EGFR) в присутствии другой молекулы (например, другого антитела EGFR), которая связывает партнера для связывания. Как правило, конкуренция означает снижение связывания на по меньшей мере приблизительно 25 процентов, как, например, на по меньшей мере приблизительно 50 процентов, например, на по меньшей мере приблизительно 75 процентов, как, например, на по меньшей мере приблизительно 90 процентов, вызванное присутствием другой молекулы, такой как антитело, определенное с помощью анализа ELISA или проточной цитометрии с применением достаточного количества двух или более конкурирующих молекул, например, антител. Дополнительные способы определения специфичности связывания с помощью конкурентного ингибирования можно найти в, например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, и Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993) и Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)).

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с таким же эпитопом на EGFR, что и антитело 7D12 и/или с таким же эпитопом на V δ 2, что и антитело 5C8. Существуют несколько способов, доступных для картирования эпитопов антител на антигенах-мишенях, известных из уровня техники, в том числе без ограничения масс-спектрометрия с перекрестным сшиванием, обеспечивающая идентификацию пептидов, которые являются частью эпитопа, и рентгенокристаллография, идентифицирующая отдельные остатки на антигене, которые образуют эпитоп. Остатки эпитопа можно определить как все аминокислотные остатки с по меньшей мере одним атомом на расстоянии 5 Å или меньше от антитела. 5 Å выбирают в качестве предельного расстояния для эпитопа для обеспечения нахождения атомов в радиусе ван-дер-ваальса с возможной опосредованной водой водородной связью. Затем остатки эпитопа можно определить как все аминокислотные остатки с по меньшей мере одним атомом на расстоянии 8 Å или меньше. Расстояние 8 Å или меньше выбирают в качестве предельного расстояния для эпитопа для обеспечения длины удлиненной аминокислоты аргинина. Масс-спектрометрия с перекрестным сшиванием начинается путем связывания антитела и антигена с масс-меченым химическим сшивающим средством. Затем присутствие комплекса подтверждается с применением выявления с помощью MALDI с высоким разрешением по массе. Потому как после химии перекрестного сшивания комплекс Ab/Ag является крайне стабильным, многие различные ферменты и условия расщепления можно применять к комплексу для обеспечения получения многих различных неперекрывающихся

пептидов. Идентификацию этих пептидов проводят с применением масс-спектрометрии с высоким разрешением и методик MS/MS. Идентификацию перекрестно-сшитых пептидов определяют с применением масс-метки, связанной с перекрестно сшитыми реагентами. После фрагментации MS/MS и анализа данных пептиды, которые являются перекрестно сшитыми и получены из антигена, являются частью эпитопа, тогда как пептиды, полученные из антитела, являются частью паратопа. Все остатки между наиболее N- и C-концевым перекрестно сшитым остатком из обнаруженных отдельных перекрестно сшитых пептидов считаются частью эпитопа или паратопа. Эпитоп антитела 7D12 определяли с помощью рентгенокристаллографии, описанной в Schmitz et al. (2013) Structure 21:1214, и он состоит из плоской поверхности на домене III (остатки R353, D355, F357, Q384, N420), который соответствует лиганд-связывающему сайту домена III.

Используемые в данном документе термины «первая» и «вторая» антигенсвязывающие области не относятся к их ориентации/положению в антителе, т. е. они не имеют значения в отношении N- или C-конца. Термины «первая» и «вторая» служат только для правильного и последовательного обозначения двух разных антигенсвязывающих областей в формуле изобретения и описании.

Используемый в данном документе термин «% идентичности последовательности» относится к количеству идентичных нуклеотидных или аминокислотных положений, общих для различных последовательностей (т. е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, которую необходимо ввести для оптимального выравнивания. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с применением алгоритма E. Meyers и W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0) с применением таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа, составляющего 12, и штрафа за гэп, составляющего 4.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления по настоящему изобретению

Как описано выше, в первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческой V δ 2, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3.

В одном варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой S (Ser). В другом варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой G (Gly).

В одном варианте осуществления X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой F (Phe). В другом варианте осуществления X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой S (Ser).

В одном варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой S (Ser) и X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой F (Phe).

В одном варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой S (Ser) и X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой S (Ser).

В одном варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой G (Gly) и X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой F (Phe).

В одном варианте осуществления X_1 в SEQ ID NO:1 представляет собой G (Gly) и X_2 в SEQ ID NO:3 представляет собой S (Ser).

В предпочтительном варианте осуществления антитело способно активировать человеческие Т-клетки $V\gamma 9V\delta 2$. Активацию Т-клеток $V\gamma 9V\delta 2$ можно измерить посредством измерения изменений в профилях экспрессии генов и/или экспрессии (поверхностного) маркера (например, маркеров активации, таких как CD25, CD69 CD107a) и/или секреторного белка (например, цитокинов или хемокинов). В предпочтительном варианте осуществления антитело способно индуцировать активацию (например, усиливать экспрессию CD69 и/или CD25), что приводит к дегрануляции, отмеченной повышением экспрессии CD107a и/или продуцированием цитокинов (например, TNF, IFN γ) Т-клетками $V\gamma 9V\delta 2$.

В предпочтительном варианте осуществления антитело способно повышать количество клеток, положительных в отношении CD107a, в по меньшей мере 2 раза, как, например, по меньшей мере 5 раз, при тестировании, описанном в примере 9 в данном документе, например, при концентрации, составляющей 1 нМ, предпочтительно 100 пМ, предпочтительно 10 пМ, предпочтительно 1 пМ, еще более предпочтительно 100 фМ. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению характеризуется значением EC50 для повышения процента CD107a-положительных клеток, составляющим 100 пМ или меньше, как, например, 50 пМ или меньше, например, 25 пМ или меньше, как, например, 20 пМ или меньше, например, 15 пМ или меньше, при тестировании с применением Т-клеток $V\gamma 9V\delta 2$ и клеток-мишеней A431, описанных в данном документе в примере 9.

В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению предусматривает однодоменное антитело, способное связываться с человеческой V δ 2, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3.

В другом варианте осуществления первая антигенсвязывающая область является гуманизированной, при этом предпочтительно антигенсвязывающая область содержит:

- последовательность, представленную под SEQ ID NO:4, или
- последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, как, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности, представленной под SEQ ID NO:4, или состоит из них.

В одном варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser). В другом варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой G (Gly). В одном варианте осуществления X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой F (Phe). В другом варианте осуществления X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser). В одном варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser) и X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой F (Phe). В одном варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser) и X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser). В одном варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой G (Gly) и X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой F (Phe). В одном варианте осуществления X₁ в SEQ ID NO:4 представляет собой G (Gly) и X₂ в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser).

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело дополнительно содержит вторую антигенсвязывающую область. В одном варианте осуществления вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело.

В дополнительном варианте осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело, где как первая антигенсвязывающая область, так и вторая антигенсвязывающая область представляют собой однодоменные антитела. В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет

собой биспецифическое антитело, где первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело и вторая антигенсвязывающая область представляют собой однодоменное антитело.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит вторую антигенсвязывающую область и вторая антигенсвязывающая область способна связывать человеческий EGFR. Как было показано, биспецифические антитела, нацеливающиеся как на V γ 9V δ 2-T-клетки, так и EGFR, индуцируют сильную V γ 9V δ 2 T-клеточную активацию и лизис опухолевых клеток в мышинной модели ксенотрасплантата как *in vitro*, так и *in vivo* (de Bruin et al. (2018) *Oncoimmunology* 1, e1375641).

В дополнительном варианте осуществления антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:5, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:6, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:7.

В одном варианте осуществления вторая антигенсвязывающая область является гуманизированной.

В дополнительном варианте осуществления антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и вторая антигенсвязывающая область содержит:

- последовательность, представленную под SEQ ID NO:8, или
- последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, как, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности, представленной под SEQ ID NO:8, или состоит из них.

В дополнительном варианте осуществления антитело конкурирует (т. е. способно конкурировать) за связывание с человеческим EGFR с антителом, имеющим последовательность, представленную под SEQ ID NO:8, при этом предпочтительно антитело связывается с таким же эпитопом на человеческом EGFR, что и антитело, имеющее последовательность, представленную под SEQ ID NO:8.

В дополнительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, где первая антиген связывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID

NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3, и где вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:5, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:6, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:7.

В дополнительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:4, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:8. В дополнительных вариантах осуществления данного документа:

X_1 в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser) и X_2 в SEQ ID NO:4 представляет собой F (Phe) или

X_1 в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser) и X_2 в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser) или

X_1 в SEQ ID NO:4 представляет собой G (Gly) и X_2 в SEQ ID NO:4 представляет собой F (Phe) или

X_1 в SEQ ID NO:4 представляет собой G (Gly) и X_2 в SEQ ID NO:4 представляет собой S (Ser).

В дополнительном варианте осуществления антитело способно опосредовать уничтожение человеческих клеток, экспрессирующих EGFR. В предпочтительном варианте осуществления антитело способно повышать опосредованное Т-клетками $V\gamma 9V\delta 2$ уничтожение экспрессирующих EGFR клеток, таких как A431, на по меньшей мере 25%, как, например, по меньшей мере 50%, например, в по меньшей мере 2 раза при тестировании, как описано в примере 9 в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления антитело не способно опосредовать уничтожение EGFR-отрицательных клеток, таких как EGFR-отрицательные человеческие клетки.

В одном варианте осуществления антитело содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область ковалентно связаны пептидным линкером, например, линкером длиной от 1 до 20 аминокислот, например, от 1 до 10 аминокислот, как, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 аминокислот. В одном варианте осуществления пептидный линкер

содержит последовательность GGGGS, представленную под SEQ ID NO:9, или состоит из нее.

В другом варианте осуществления антитело содержит первую антигенсвязывающую область и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область, способная связывать человеческую V δ 2, расположена на С-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать человеческий EGFR.

В одном варианте осуществления по настоящему изобретению антитело дополнительно содержит домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни. В одном варианте осуществления антитело характеризуется конечным периодом полужизни, который составляет не дольше чем приблизительно 168 часов при введении субъекту-человеку. Более предпочтительно конечный период полужизни составляет 336 часов или дольше. Используемый в данном документе термин «конечный период полужизни» относится ко времени, необходимому для снижения концентрации полипептида в сыворотке крови на 50% *in vivo* в конечной фазе элиминации.

В одном варианте осуществления антитело дополнительно содержит домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, и домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, представляет собой Fc-область. В дополнительном варианте осуществления антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, содержащее Fc-область. Различные способы для получения биспецифических антител описаны в данной области техники, например, рассмотрены Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9:182. В одном варианте осуществления по настоящему изобретению Fc-область представляет собой гетеродимер, содержащий два Fc-полипептида, где первая антигенсвязывающая область слита с первым Fc-полипептидом и вторая антигенсвязывающая область слита со вторым Fc-полипептидом, и где первый и второй Fc-полипептиды содержат асимметричные мутации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимеров по сравнению с образованием гомодимеров (см., например, Ridgway et al. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617). В дополнительном варианте осуществления настоящего документа области CH3 Fc-полипептидов содержат указанные асимметричные мутации аминокислот, предпочтительно первый Fc-полипептид содержит замену T366W и второй Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V или наоборот, где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой EU-нумерации. В дополнительном варианте осуществления цистеиновые остатки в положении 220 в первом и втором Fc-полипептидах удаляли или заменяли, при этом

аминокислотные положения соответствовали IgG1 человека в соответствии с системой EU-нумерации. В дополнительном варианте осуществления область содержит шарнирную последовательность, представленную под SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептиды содержат мутации, которые делают антитело инертным, т. е. неспособным опосредовать эффекторные функции, или характеризующимся сниженной к этому способностью. В одном варианте осуществления инертная Fc-область, в дополнение, не способна связывать C1q. В одном варианте осуществления первый и второй Fc-полипептиды содержат мутацию в положении 234 и/или 235, предпочтительно первый и второй Fc-полипептиды содержат замену L234F и L235E, где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой EU-нумерации. В другом варианте осуществления антитело содержит мутацию L234A, мутацию L235A и мутацию P329G. В другом варианте осуществления антитело содержит мутацию L234F, мутацию L235E и мутацию D265A.

В предпочтительном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:4, вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:8, и

- первый Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:11, и второй Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:12, или

- первый Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:11, и второй Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:12.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит шарнирную последовательность, представленную под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17, или состоит из нее.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит шарнирную последовательность, представленную под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:18, или состоит из нее.

В дополнительном главном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело в соответствии с настоящим изобретением, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемое

вспомогательное вещество.

Антитела можно составлять с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами в соответствии с общепринятыми методиками, такими как методики, раскрытые в Rowe et al. 2012 Handbook of Pharmaceutical Excipients, ISBN 9780857110275). Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, а также любые другие носители, разбавители или адъюванты могут быть подходящими для антител и выбранного способа введения. Приемлемость для вспомогательных веществ и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основе отсутствия значительного отрицательного влияния в отношении требуемых биологических свойств выбранного антитела или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем существенное влияние (10% или меньше относительно подавления, 5% или меньше относительно подавления и т. д.) при связывании антигена).

Фармацевтическая композиция может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионные детергенты, такие как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы ткани, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Дополнительные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают любые или все подходящие растворители, диспергирующие среды, покрытия, противомикробные и противогрибковые средства, изотонические средства, антиоксиданты и средства, задерживающие абсорбцию, и т. п., которые являются физиологически совместимыми с антителом по настоящему изобретению.

В дополнительном главном аспекте настоящее изобретение относится к антителу в соответствии с настоящим изобретением, описанном в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением способно создавать микроокружение, которое является полезным для уничтожения опухолевых клеток Т-клетками V γ 9V δ 2. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении первичного или метастатического рака толстой кишки или колоректального рака. В одном варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении рака брюшины. В одном варианте осуществления антитело предназначено для применения в

лечении рака печени. В другом варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC). В одном варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). В другом варианте осуществления антитело предназначено для применения в лечении плоскоклеточной карциномы кожи.

Аналогично, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение мультиспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением, описанного в данном документе, субъекту-человеку, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой рак.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в качестве средства монотерапии. Однако антитела по настоящему изобретению можно вводить в составе комбинированной терапии, т. е. комбинировать с другими терапевтическими средствами, относящимися к заболеванию или состоянию, подлежащим лечению.

Термин «лечение» относится к введению эффективного количества антитела в соответствии с настоящим изобретением с целью ослабления, облегчения, купирования, устранения (излечения) или предупреждения симптомов или болезненных состояний. Термин «эффективное количество» относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического результата. Эффективное количество полипептида, такого как антитело, может варьировать в соответствии с факторами, такими как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, и способностью антитела вызывать требуемый ответ у индивидуума. Эффективное количество является также таким количеством, при котором терапевтически благоприятные эффекты превышают любые токсические или отрицательные эффекты антитела. Введение можно осуществлять любым подходящим путем, но, как правило, его осуществляют парентеральным, таким как внутривенный, внутримышечный или подкожный путь введения.

Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению, как правило, получают рекомбинантным путем, т. е. путем экспрессии конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих антитела, в подходящих клетка-хозяевах с последующей очисткой полученного рекомбинантного антитела из культуры клеток. Конструкции нуклеиновой кислоты можно получить с помощью стандартных молекулярно-биологических методик, известных из уровня техники. Конструкции, как правило, вводят в клетку-хозяина с применением вектора экспрессии. Подходящие конструкции нуклеиновой кислоты и

векторы экспрессии являются известными из уровня техники. Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, являются хорошо известными из уровня техники и включают клетки CHO, HEK-293, Expi293F, PER-C6, NS/0 и Sp2/0.

Соответственно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления конструкция представляет собой конструкцию ДНК. В другом варианте осуществления конструкция представляет собой конструкцию РНК.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело в соответствии с настоящим изобретением.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело в соответствии с настоящим изобретением, или вектору экспрессии, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело в соответствии с настоящим изобретением.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления антитела по настоящему изобретению, включающему экспрессию одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело в соответствии с настоящим изобретением, в клетке-хозяине.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления клинической серии антитела по настоящему изобретению, включающему экспрессию одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело в соответствии с настоящим изобретением, в клетке-хозяине. Используемый в данном документе термин «клиническая серия» относится к композиции продукта, подходящей для применения на людях.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления антитела, не предусматривающему сульфатирование тирозина, включающему экспрессию одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело в соответствии с настоящим изобретением, в клетке-хозяине.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения сульфатирования тирозина антитела, способного активировать человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, при этом указанный способ включает конструирование

нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по настоящему изобретению, и получение указанного антитела путем экспрессии указанной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения препарата гомогенного антитела, способного активировать человеческие Т-клетки V γ 9V δ 2, при этом указанный способ включает конструирование нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по настоящему изобретению, и получение указанного антитела путем экспрессии указанной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин в описанном выше способе изготовления представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO или клетки НЕК, или клетка дрожжей, такая как клетка *Pichia pastoris*.

Таблица 1. Перечень последовательностей.

SEQ ID.	код	Описание	Последовательность
1	5C8 var	CDR1	NYAMX ₁ , где X ₁ представляет собой S или G
2	5C8 var	CDR2	AISWSSGGSTSYADSVKG
3	5C8 var	CDR3	QFSGADX ₂ GFGRLGIRGYEYDY, где X ₂ представляет собой F или S
4	5C8 var	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAM X ₁ WFRQAPGKEREFSVAISWSSGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGAD X ₂ GFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS, где X ₁ представляет собой S или G и где X ₂ представляет собой F или S
5	7D12	CDR1	SYGMG
6	7D12	CDR2	GISWRGDSTGYADSVKG
7	7D12	CDR3	AAGSAWYGTLYEYDY
8	7D12var 8	VHH	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGLTVTVSS

9	линкер		GGGGS
10		Модифицированный шарнир	AAASDKTHTCPPCP
11	IgG1 L234F L235E T366W	Вариант константной области тяжелой цепи	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
12	IgG1 L234F L235E T366S L368A Y407V	Вариант константной области тяжелой цепи	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
13	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFNSY AMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTSYADS VKGRFTISRDNKNTVYLQMNSPKPEDTAIYY CAAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
14	5C8var1	VHH	EVQLLES GGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFNSY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWGGSTSYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVT VSS
15	5C8	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
16	7D12var 8-Fc	VHH-Fc	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTSRSY GMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADS

			<p>VKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRAEDTAVY YCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT LVTVSS AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
17	5C8var1 (Y105F)- Fc	VHH-Fc	<p>EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNY AMSWFRQAPGKEREFSVAISWSSGGSTSYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAQFSGADFGFRLGIRGYEYDYWGQGTQVT VSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>
18	5C8var1 (Y105S)- Fc	VHH-Fc	<p>EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYA MSWFRQAPGKEREFSVAISWSSGGSTSYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AQFSGADSGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTV SSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK</p>

Все ссылки, статьи, публикации, патенты, публикации патентов и заявки на патент, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Однако упоминание любой ссылки, статьи, публикации, патента, публикации патента и заявки на патент в данном документе не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения о том, что они представляют собой действительный предшествующий уровень техники или образуют часть общеизвестных знаний в любой стране мира.

ПРИМЕРЫ

Пример 1| Получение и очистка соединений VHH

Соединения VHH в основном получали путем временной трансфекции кодирующих плазмид в клетках НЕК293-Е 253 и очистки белков из кондиционированной среды (через неделю после получения) с помощью аффинной хроматографии на основе белка А с последующей препаративной гель-фильтрацией. Доминантный мономерный пик (фракции 1E11-1G2), наблюдаемый в препаративной эксклюзионной хроматографии с применением колонки Superdex-75, очищали: фигура 1.

Было показано, что очищенные белки мигрируют в виде одной полосы в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в электрофорезе в полиакриламидном геле: на фигуре 2 показаны иллюстративный пример.

Пример 2| Анализ HP-SEC очищенных соединений VHH

Систему Waters Acquity ARC-bio применяли для анализа HP-SEC очищенных соединений VHH. 10 мкг антитела (10 мкл антитела с концентрацией, составляющей 1 мг/мл) вводили в колонку Waters BEH200 SEC (размер гранул 2,5 мкм, размеры колонки 7,8 x 300 мм). Подвижную фазу, включавшую 50 мМ фосфата натрия, 0,2 М буфера хлорида натрия, рН, составляющее 7,0, скорость буфера, составляющую 0,8 мл/мин., применяли для прогона. Белок выявляли путем измерения абсорбции при длине волны, составляющей 214 нм. Общее время анализа составляло 15 минут на инъекцию. Соединения VHH получали и очищали, как описано в примере 1. Неожиданно, когда VHH 5C8 (SEQ ID NO:13) (ранее описанный в WO2015156673) и 5C8var1 (SEQ ID NO:14) (ранее описанный в WO2020060405) тестировали в анализе HP-SEC в отношении целостности и мономерности, наблюдали два пика: фигура 3.

Пример 3| С помощью масс-спектрального анализа 5C8 выявляют дополнительную массу, составляющую 80 Да

Для определения, отличаются ли две изоформы 5C8 по массе, препарат белка 5C8 анализировали посредством масс-спектрометрии LC-ESI-MS. Главным соединением, обнаруженным в этом анализе, являлась 5C8 без посттрансляционных модификаций или сигнального пептида. Вторым соединением был белок с разницей масс +80,3 Дальтон (Да), что указывало на возможное сульфатирование или фосфорилирование. Дополнительно это исследовали путем обработки фосфатазой или сульфатазой и с помощью последующего масс-спектрального анализа LC-ESI-MS пептидов после протеолитического расщепления. Было показано, что обработка сульфатазой уменьшала массу пептидов, содержащих Y105, 7-й остаток CDR3 (SEQ ID NO:15), на 80 Да, тогда как обработка фосфатазой не оказывала эффекта. Это доказывает, что Y105 в 5C8 является посттрансляционно модифицированным посредством сульфатирования. Это сульфатирование присутствовало в около 30% препарата белка.

Пример 4| 1D12var5-5C8var1, содержащее такие же VHH к V γ 9V δ 2, демонстрирует гетерогенность в HP-SEC и такую же дополнительную массу, составляющую 80 Да

1D12var5-5C8var1 представляет собой биспецифическое соединение VHH, состоящее из VHH к CD1d, связанного посредством гибкого линкера с 5C8var1 (описанного в последовательности под SEQ ID NO:87 в WO2020060405). Этот белок экспрессировался в клетках НЕК 293 Е, как описано выше. В дополнение, препараты белка получали из разных систем экспрессии: биспецифическое VHH также экспрессировали в *Pichia pastoris* и в клетках яичника китайского хомячка (СНО). При тестировании разных препаратов белков в анализе HP-SEC систематически наблюдали пик примеси, расположенный перед главным пиком: фигура 4.

Наблюдаемый пик примеси, расположенный перед главным пиком, указывает на значительный процент белка, снова являющегося отличным по изоформе. Было показано, что 5C8 VHH сульфатировали и 5C8var1 содержит точно такую же последовательность CDR3, при этом серии 1D12var5-5C8var1 также анализировали посредством масс-спектрометрии в отношении их молекулярной массы. Обнаруживали, что в зависимости от серии белка от 15% до 40% характеризуется дополнительной массой, составляющей 80 Да. Это согласуется с сульфатированием, наблюдаемым в отношении VHH 5C8.

Пример 5| Анализ *in silico* VHH 5C8 и 5C8var1

Гомологическую модель 5C8 и 5C8var1 строили с применением Maestro (Schrödinger) на основе PDB ID 5M2W. CDR1 и CDR3 требовали уточнения с помощью прогнозирования

de novo с применением Prime (Schrödinger). Полученные модели демонстрировали, что остаток CDR3 Y105 показывает площадь поверхности с высокой доступностью для растворителя, составляющую 205,1 Å², в модели 5C8var1 и 122.2 Å² в модели 5C8 и, следовательно, ожидается, что он будет способствовать связыванию антигена. Следовательно, модели анализировали в отношении реактивных остатков, указывая на остатки, которые склонны к посттрансляционным модификациям (PTM). Затем последовательности белков анализировали с применением ModPred, инструмента прогнозирования PTM на основе последовательности. Модификации, которые прогнозировали, как в структуре, так и в последовательности, перечислены в таблице 2. Отдельные прогнозируемые PTM невозможно объяснить разницей масс, наблюдаемой в анализе HP-SEC.

Таблица 2 | Прогнозируемые PTM в Maestro и ModPred для 5C8 и 5C8var1. Тип описывает PTM, прогнозируемый Maestro *Деамидирование Q13 предсказывали только для 5C8.

Номер остатка	Остаток	Тип
13*	Q	Деамидирование
32	Y	Окисление
39	Q	Деамидирование
60	Y	Окисление
62	D	Протеолиз (ASP)
73	D	Протеолиз (ASP)
74	N	Деамидирование
80	Y	Окисление
84	N	Деамидирование
90	D	Протеолиз (ASP)
94	Y	Окисление
95	Y	Окисление
104	D	Протеолиз (ASP)
105	Y	Окисление
115	Y	Окисление
117	Y	Окисление
118	D	Протеолиз (ASP)
119	Y	Окисление
122	Q	Деамидирование

Пример 6 | Конструирование и получение мутантных вариантов Y105F и Y105S CDR3 5C8var1 VHH

Гомологические модели, описанные в примере 5, применяли для введения мутаций, которые предупреждали бы сульфатирование Y105 в 5C8 и 5C8var1. Два различных мутантных варианта сконструировали на основании структуры модели VHH: Y105S

(сохранение спиртовой функции) и Y105F (сохранение ароматического кольца). Остаток Y105 представляет собой 7-й остаток CDR3; при введении мутаций ожидали эффект в отношении связывания. Обе мутации конструировали в гуманизированной последовательности VHH 5C8var1 и оба белка получали в клетках HEK293E и очищали, как описано выше. Аминокислотную последовательность CDR3 гуманизированного VHH сохраняли идентичной одному из негуманизированных.

Как 5C8var1-Y105F, так и 5C8var1-Y105S хорошо продуцировались и проявлялись в виде мономерных белков в препаративной эксклюзионной хроматографии (данные не показаны). Оба белка являлись высоко очищенными (фигура 5) и мигрировали как отдельное соединение в электрофорезе в полиакриламидном геле.

Пример 7 | Анализ HP-SEC очищенного VHH, содержащего сконструированные мутации CDR3

Анализ HP-SEC проводили, как описано для 5C8. Анализировали как 5C8var1-Y105F, так и 5C8var1-Y105S (фигура 6).

Как можно сделать вывод из анализа HP-SEC очищенных молекул VHH, содержащих сконструированные мутации CDR3, никакой гетерогенности больше не наблюдали ни для одного мутантного варианта. Это указывало на отсутствие наблюдаемой посттрансляционной модификации Y105 и на то, что белки являлись гомогенными.

Пример 8 | Измерение аффинности 5C8var1, 5C8var1-Y105F и 5C8va1-Y105S с применением биослойной интерферометрии (BLI) не демонстрирует разницы в аффинности.

Связывание фрагмента антитела 5C8var1 VHH и вариантов 5C8var1-Y105F и 5C8var1-Y105S с Vy9Vδ2-TCR измеряли посредством биослойной интерферометрии с применением прибора Octet RED96 (ForteBio). Рекомбинантный человеческий слитый белок Vy9Vδ2-Fc (20 мкг/мл) захватывали в качестве лиганда на биосенсорах захвата антитела к человеческой Fc. Записывали сенсограммы, когда лиганд, захваченный биосенсорами, инкубировали с серией разбавлений фрагментов антитела VHH (от 40 до 0,63 нМ) в 10-кратном кинетическом буфере (ForteBio). Глобальные данные, соответствующие модели связывания 1:1, применяли для оценки значений k_{on} (константа скорости ассоциации) и k_{off} (константа скорости диссоциации). Эти значения применяли для расчета KD (равновесной константы диссоциации) с применением $KD = k_{off}/k_{on}$.

Как можно заключить из фигуры 7 и из таблицы 3, значения KD, обнаруженные для двух разных мутантных вариантов Y105 VHH, существенно не отличалась от

обнаруженного значения для 5C8var1. Особенно мутантный вариант Y105F характеризовался аффинностью, сравнимой с таковой, обнаруженной для 5C8var1.

Таблица 3 Значения аффинности, обнаруженные в измерениях BLI связывания VHH с рекомбинантным белком TCR V γ 9V δ 2. Представленные значения представляют собой средние величины по меньшей мере трех независимых измерений +/- стандартное отклонение.

Соединение VHH	KD (нМ) +/- SD
5C8var1	0,81 +/- 0,02
5C8var1-Y105F	0,78 +/- 0,23
5C8var1-Y105S	1,59 +/- 0,31

Пример 9 | Функциональность биспецифического VHH к (EGFR x TCR V γ 9V δ 2), содержащего мутацию Y105F, является полностью сохраненной

Для определения того, может ли равная аффинность VHH 5C8var1-Y105F по сравнению с 5C8var1 быть переведена в сопоставимую функциональность, сконструировали биспецифическое VHH 7D12var8-5C8var1-Y105F: гуманизированное VHH 7D12var8 к EGFR (на основе VHH, описанного в Gainkam et al. (2008) J Nucl Med 49(5):788) связывали посредством линкера G4S с 5C8var1-Y105F VHH с образованием 7D12var8-5C8var1-Y105F. Две молекулы VHH разделяли посредством гибкой линкерной последовательности G4S. Эту молекулу получали и очищали, как описано выше, и затем тестировали в отношении ее способности индуцировать V γ 9V δ 2 Т-клеточную активацию в зависимости от линии EGFR-положительных опухолевых клеток (A431) и вызывать опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток. Вкратце, Т-клетки V γ 9V δ 2 выделяли из крови здоровых доноров с применением активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) в комбинации с антителом к V δ 2 в соответствии со стандартизированными процедурами. Затем эти клетки увеличивали в количестве в течение недели с применением смеси цитокинов и облученных питающих клеток: смеси линии клеток JY и РВМС от другого донора. Т-клетки V γ 9V δ 2 являлись всегда >90% чистыми (окрашены дважды положительными для V γ 9 и для V δ 2 в FACS) при применении в анализе. Линию клеток A431 (ATCC, № по кат. CRL-1555) культивировали в соответствии с рекомендацией поставщика. Для анализа активации или цитотоксичности 50000 опухолевых клеток-мишеней высевали на 96-луночные планшеты для культур тканей за день до анализа. На следующий день 50000 увеличенных в количестве, очищенных Т-клеток V γ 9V δ 2 добавляли к среде вместе с биспецифическим соединением VHH в диапазоне концентраций. В анализе активации дегрануляцию Т-клеток V γ 9V δ 2 оценивали с

применением смеси меченных антител к CD3 и к CD107A, которые добавляли к смеси. Через 4 часа клетки собирали, промывали и анализировали посредством FACS в отношении экспрессии маркера дегрануляции CD107A. Для анализа цитотоксичности надосадочные жидкости совместных культур исследовали на следующий день в отношении присутствия протеазы (указывающей на клеточную гибель) с применением набора анализа цитотоксичности CytoTox-Glo: (Promega G9290). Лизис клеток с применением детергента применяли для установления 100% уничтожения в конце анализа. На фигуре 8 показаны данные.

На фигуре 8 показано, что 7D12var8-5C8var1-Y105F, а также негуманизованное 7D12-5C8 индуцировали сильную $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеточную активацию и лизис опухолевых клеток. Эти результаты согласуются с эффективностью негуманизованной молекулы-предшественника без мутации Y105 7D12wt-5C8. В таблице 4 показаны значения EC50, которые получали после аппроксимации кривой. 7D12var8-5C8var1-Y105F характеризовалось немного более низкой EC50 в анализе цитотоксичности по сравнению с 7D12-5C8.

Таблица 4 | Значения EC50, обнаруженные после аппроксимации кривой данных, представлены на фигуре 8 с применением программного обеспечения GraphPad.

Применяемое антитело	Дегрануляция, EC50 (пМ)	Цитотоксичность, EC50 (пМ)
7D12-5C8	10	9
7D12var8-5C8var1-Y105F	11	2,5

Максимальный уровень уничтожения опухолевых клеток являлся немного ниже в случае 7D12var8-5C8var1-Y105F по сравнению с уровнем уничтожения опухолевых клеток, наблюдаемых для 7D12-5C8. Однако это были два разных измерения с применением двух разных $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеточных доноров и этот максимальный уровень цитотоксичности может являться особенно зависимым от донора.

Пример 10 | Температурная стабильность VHH 5C8var1, содержащего мутации Y105, не изменялась

Для определения того, влияет ли мутация, введенная в различные варианты, на термостабильность фолдинга VHH, температуры плавления мутантных вариантов измеряли с применением NanoDSF (дифференциальная сканирующая флуориметрия). Образцы антитела разбавляли с применением PBS, пока они не являлись эквивалентными образцу с самой низкой концентрацией. Затем образцы антитела помещали в капилляры nanoDSF и

проводили измерение с помощью Prometheus NT.48. На протяжении эксперимента температуру повышали от 20 до 95°C. Собственную флуоресценцию белка выявляли при 350 и 330 нм и записывали вместе с количеством отраженного света. Из этих измерений определяли очевидную температуру плавления (T_m) и начало агрегации (T_{agg}). Для всех трех фрагментов антител сообщали начальную температуру плавления (T_{on}) и температуру плавления (T_m), при которой VHH являлись полностью несвернутыми (таблица 4). Температуры плавления, измеренные для 5C8var1-Y105F и 5C8var1-Y105S, согласуются с температурой 5C8var1. Таблица 4.

Таблица 4 | 5C8var1-Y105F и 5C8var1-Y105S демонстрирует аналогичные температуры плавления, как и 5C8var1, что указывает на то, что введенные мутации не нарушают стабильность.

	T_{on} (°C)	T_m (°C)
5C8var1	61,8	86,7
5C8var1-Y105F	64,5	85,5
5C8var1-Y105S	63,9	86,6

Пример 11 | Биспецифические конструкции (содержащие Fc) с удлиненным периодом полужизни

Для получения молекулы с более длинным периодом полужизни в плазме крови *in vivo* биспецифический VHH 7D12var8-5C8var1-Y105F был переформатирован в формат терапевтического антитела, содержащего человеческую Fc. Оба домена VHH соединяли с человеческим Fc-доменом IgG1 (например, CH2 и CH3) со следующими характеристиками: VHH соединяли с модифицированным шарниром (AAA с последующими SDKTHTCPPCP, цистеин в положении 220 удаляли) и человеческими доменами CH2 и CH3. Домен CH2 подвергали сайленсингу с помощью Fc посредством мутационной пары LFLE (L234F, L235E) и домены CH3 подвергали мутации с мутациями типа «выступы-во-впадины» (выступ: T366W и впадина: T366S, L368A и Y407V), которые обеспечивают гетеродимеризацию при совместной экспрессии двух цепей в такой же клетке. Эту мутационную пару описывали в научной литературе (Ridgway et al. (1996) Protein Eng 9:617). Последовательности конструкции представлены под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17. Образующуюся конструкцию антитела 7D12var8-5C8var1(Y105F) с Fc-областью называли 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc. Аналогично, получали конструкцию, где Y в положении 105

заменяли S (7D12var8-5C8var1(Y105S)-Fc). Последовательности той конструкции представлены под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:18.

Белок получали посредством совместной трансфекции кодирующих двух векторов экспрессии в клетках HEK293E и очистки от надосадочной жидкости культуры с помощью аффинной хроматографии с помощью белка A с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией, как описано в примере 1. В результате получали высокомономерный препарат белка.

Пример 12| Связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с первичными T-клетками V γ 9V δ 2, выделенными из PBMC здоровых людей

Для демонстрации связывания 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с T-клеточным рецептором (TCR) V γ 9V δ 2 T-клетки V γ 9V δ 2 человека выделяли из здоровых мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) и впоследствии увеличивали в количестве, как описано (de Bruin et al., Clin. Immunology 169 (2016), 128-138; de Bruin et al., J. Immunology 198(1) (2017), 308-317). Затем увеличенные в количестве поликлональные и чистые (>95%) T-клетки V γ 9V δ 2 высевали при концентрации, составляющей 50000 клеток/лунка и инкубировали с либо антителами 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc, либо антителами GP120-5C8var1(Y105F)-Fc в качестве положительного контроля в полулогарифмическом титровании, начиная со 100 нМ в течение одного часа при 4°C. Связывание антител с TCR V γ 9V δ 2 визуализировали посредством проточной цитометрии с применением флуоресцентно меченного вторичного антитела к IgG1. На фигуре 9 показан сигнал средней интенсивности флуоресценции (MFI) окрашивания антитела к IgG1, как измерено посредством проточной цитометрии для двух разных доноров PBMC (D336 и D339). Сигмоидальные кривые подчеркивают значительное связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с T-клетками V γ 9V δ 2 с половинной максимальной эффективной концентрацией (EC50) в низком наномолярном диапазоне (~ 3 нМ).

Пример 13| Связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с EGFR-положительными опухолевыми клетками посредством клеточного ELISA.

Связывание 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) тестировали в клеточном твердофазном иммуоферментном анализе (ELISA) с применением линий опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR, A-431, HCT-116 и HT-29. С этой целью опухолевые клетки сначала высевали в различных концентрациях в день - 1 для достижения концентрации, составляющей примерно 50000 клеток/лунка в день 0. В

день 0 титр, полученный из полулогарифмического титрования антител 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc или антител GP120-5C8var1(Y105F)-Fc в качестве отрицательного контроля, добавляли к опухолевым клеткам, начиная со 100 нМ в течение одного часа при 37°C. Затем связанные антитела метили во вторичной стадии инкубирования с антителом к IgG1-HRP в течение одного часа при 37°C. Затем связывание вторичного антитела устраняли посредством добавления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и колориметрического изменения, индуцированного HRP, с последующим добавлением H₂SO₄ для остановки реакции. Затем измеряли оптическую плотность (OD) в UV-спектрометре при длине волны, составляющей 450 нм. На фигуре 10 показано, что 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc прочно связывается с опухолевыми клетками A-431, HCT-116 и HT-29 с EC₅₀, составляющей ~7 нМ, тогда как ненацеливающееся контрольное антитело не связывало в измеряемой степени ни одну из протестированных клеточных линий.

Пример 14| Дегрануляция Т-клеток V γ 9V δ 2, зависящая от клеток A-431, индуцированная 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc

Для исследования потенциала 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc активировать Т-клетки V γ 9V δ 2 Т-клетки V γ 9V δ 2 сначала выделяли и увеличивали в количестве, как описано выше. Затем Т-клетки V γ 9V δ 2 культивировали вместе с опухолевыми клетками A-431 в соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии различных концентраций антитела 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc и PE-меченого флуоресцентного антитела к CD107a. Через 24 ч. клетки собирали и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами к V γ 9 и CD3 для дифференцировки Т-клеток V γ 9V δ 2 из опухолевых клеток. С применением проточной цитометрии исследовали степень экспрессии CD107a на Т-клетках V γ 9V δ 2, что отражает зависимость от мишени дегрануляцию. На фигуре 11 показано, что с возрастанием концентраций 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc Т-клетки V γ 9V δ 2 эффективно индуцировались к дегрануляции, зависящей от клеток A-431. EC₅₀ для дегрануляции Т-клеток V γ 9V δ 2, индуцированной 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc, находится в пиколярном диапазоне (~40-90 пМ).

Пример 15| Антитело 7D12-5C8 индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность клеток-мишеней

Для исследования, эффективен ли биспецифический VHH 7D12-5C8 в индуцировании опосредованной Т-клетками V γ 9V δ 2 цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, жизнеспособность линии клеток эпидермоидной опухоли A-388 (ATCC, CRL-7905) оценивали в условиях совместного культивирования с Т-клетками V γ 9V δ 2 и

фрагментом антитела bsVНН. В этом анализе применяли Т-клетки V γ 9V δ 2, которые выделяли из здоровых РВМС, как описано ранее, но впоследствии замораживали и хранили при температуре -150°C. Замороженные Т-клетки V γ 9V δ 2 оттаивали и оставляли на ночь в среде с добавлением ИЛ-2. Опухолевые клетки А-388 высевали либо в отдельности, либо с оставшимися Т-клетками V γ 9V δ 2 в соотношении, составляющем 1:1 или 1:0,1 с 7D12-5C8(10 нМ) или без него. В качестве дополнительного контроля Т-клетки V γ 9V δ 2 высевали в отдельности с антителом 7D12-5C8(10 нМ) или без него. Через 72 ч. определяли жизнеспособность клеток путем добавления ATP Lite (Perkin Elmer, 6016731) и считывания люминесцентного сигнала с помощью микропланшетного ридера. На фигуре 12 показан полученный из ATP флуоресцентный сигнал, представляющий метаболическую активность клеток и, следовательно, количество жизнеспособных клеток. При соотношении Е:Т, составляющем 1:1, можно наблюдать, что антитело индуцирует снижение количества жизнеспособных клеток на 50%, тогда как необработанные совместные культуры Т-клеток А-388 и V γ 9V δ 2 не поражаются, что подчеркивает его потенциал индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность.

Пример 16| Уничтожение опухолевых клеток активированными Т-клетками V γ 9V δ 2 7D12-5C8 и 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc

Для исследования того, способны ли bsVНН 7D12-5C8 и антитело 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc индуцировать опосредованную Т-клетками V γ 9V δ 2 цитотоксичность в отношении полученных от пациента опухолевых клеток, жизнеспособность таких опухолевых клеток оценивали в условиях совместного культивирования с Т-клетками V γ 9V δ 2 и антителами. Тестировали различные разные типы опухолевых клеток.

Образцы тканей (т. е. материал первичной и метастатической опухоли, полученный из толстой кишки, брюшины и печени, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) и немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC)) собирали у пациентов, имеющих рак, в УМС в Амстердаме (местоположение VUmс) после письменного информированного согласия. Ткань разрезали на небольшие кусочки хирургическим лезвием (размер № 22; Swann Morton Ltd), ресуспендировали в среде для диссоциации, состоящей из IMDM с добавлением 0,1% ДНКазы I, 0,14% коллагеназы А, 5% FCS, 100 МЕ/мл пенициллина натрия, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2,0 мМ L-глутамин, переносили в стерильную колбу с магнитной мешалкой и инкубировали на магнитной мешалке в течение 45 минут на водяной бане при 37°C. После инкубирования суспензии клеток пропускали через клеточные сита с размером пор 100 мкм. Опухоль диссоциировали три раза, после

чего клетки промывали для подсчета жизнеспособных клеток с исключением трипанового синего.

Диссоциированные, полученные от пациентов, опухолевые клетки инкубировали с полученными от здоровых доноров Т-клетками V γ 9V δ 2 (соотношение E:T, составляющее 1:1) в присутствии или в отсутствие 50 нМ 7D12-5C8 в течение 4 часов, или 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc, или gp120-5C8var1(Y105S)-Fc в течение 24 часов.

Адгезивные клетки при необходимости отделяли после периода культивирования с применением трипсин-EDTA и ресуспендировали в буфере FACS (PBS с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 20 мкг/мл NaN₃), инкубировали с антителами, мечеными флуоресцентным красителем, в течение 30 минут при 4 градусах, после чего степень окрашивания измеряли с помощью проточной цитометрии с применением LSR Fortessa XL-20 (BD).

Жизнеспособные клетки идентифицировали с применением маркера жизни/гибели 7AAD в комбинации с 123counting eBeadsTM в соответствии с инструкциями производителя. Данные проточной цитометрии анализировали с применением анализа Kaluza версии 1.3 (Beckman Coulter) и FlowJo версии 10.6.1 И 10.7.2 (Becton Dickinson).

Индукцированную 7D12-5C8 и 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc, опосредованную Т-клетками V γ 9V δ 2 цитотоксичность опухолевых клеток оценивали путем инкубирования увеличенных в количестве, полученных от здоровых доноров Т-клеток V γ 9V δ 2 с суспензиями отдельных клеток различных злокачественных опухолей (первичный CRC, CRC с метастазами в брюшине и печени, плоскоклеточный рак головы и шеи и немелкоклеточная карцинома легкого).

Как проиллюстрировано на фигуре 13, 7D12-5C8 индуцировало значительный лизис опухолевых клеток пациента Т-клетками V γ 9V δ 2 (средний % лизиса, индуцированного 7D12-5C8: первичный CRC - 52,3% и р-значение, составляющее 0,0003, CRC с метастазами брюшины - 46,0% и р-значение, составляющее 0,0052, CRC с метастазами печени - 31,8% и р-значение, составляющее 0,0360, плоскоклеточный рак головы и шеи - 46,1% и р-значение, составляющее 0,0187, и немелкоклеточная карцинома легкого - 64,1% и р-значение, составляющее 0,0153).

Кроме того, как показано на фигуре 14, 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc индуцировало значительное количество случаев лизиса опухолевых клеток пациента Т-клетками V γ 9V δ 2 (средний % лизиса, индуцированного 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc: 71,2% и р <0,0001 и

0,0012). Контрольное соединение gp120-5C8var1(Y105S)-Fc не индуцировало измеряемого лизиса опухолевых клеток.

Пример 17| Конструирование, получение и очистка конструкции для исследований на приматах, отличных от человека

Для исследований *in vivo* на приматах, отличных от человека, получали конструкцию со связывающим доменом, который перекрестно реагирует с цепью TCR V γ 9 яванского макака (фигура 15). Этот связывающий домен был образован на основе антитела 7A5, TCR V γ 9-специфического антитела (Janssen et al., J. Immunology 146(1) (1991), 35-39). Обнаруживали, что антитела на основе 7A5 связывают Т-клетки V γ 9V δ 2 яванского макака (см. пример 1 WO2021052995). Конструировали биспецифическое Fc-содержащее антитело, содержащее 7A5 и VHH 7D12var8 к EGFR. Молекула содержала Fc-хвост IgG1 человека, который сконструировали для гетеродимеризации с применением технологии «выступ-во-впадину» (KiH; Carter et al., 2001 Imm. Meth. 2001: 248, 7; выступ: T366W; впадина: T366S, L368A и Y407V). Связывающий V γ 9 scFv антитела 7A5 соединяли с цепью «выступ»; связывающий EGFR VHH 7D12var8 клонировали в рамке считывания с цепью «впадина» пары KiH Fc. В дополнение, верхний шарнир конструировали как «AAASDKTHTCPPCP» для удаления цистеина (C220), который обычно соединяется с CL, и для введения большей гибкости путем замены «EPK» на «AAA». N-концевую часть CH2 конструировали для отмены взаимодействия Fc-рецептора (CD16, -32 и -64) (подвергая сайленсингу мутации L234F, L235E), сохраняя при этом связывание FcRN. Образующуюся конструкцию называли 7A5-7D12var8-Fc.

Белок получали посредством временной совместной трансфекции двух плазмид, кодирующих две разные цепи в клетках HEK293E и очищали от надосадочной жидкости культуры с помощью аффинной хроматографии на основе белка А с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (пример 1). Было показано, что молекула связывается с очевидной аффинностью, составляющей около 3 наномолей (нМ), с любой мишенью с применением ELISA и рекомбинантных форм обоих антигенов (фигура 16). Функциональность молекулы была продемонстрирована путем демонстрации того, что она вызывала зависимую от мишени активацию (экспрессия CD107a) увеличенных в количестве Т-клеток V γ 9V δ 2 *in vitro* и последующий опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток (фигура 17).

Пример 18| Биспецифическое антитело 7A5-7D12var8-Fc хорошо переносилось в предварительном исследовании многократного введения на приматах, отличных, от человека (NHP: яванский макак)

В поисковом исследовании многократных доз на NHP 7A5-7D12var8-Fc вводили трем самкам яванских макаков в дозах, составляющих 1 мг/кг, 5 мг/кг и 23 мг/кг соответственно. Антитело вводили в виде получасовых инфузий по 5 мл/кг; вводили 4-недельные инфузии. Первые две дозовые группы (1 животное на дозу), получающие 1 и 5 мг/кг, получали дозу одновременно и после трех (еженедельных) доз третья дозовая группа (23 мг/кг) получала первую дозу. У животных регулярно брали кровь для анализов РК, анализов параметров клинической химии, измерений уровней цитокинов и для анализов субпопуляций клеток крови с помощью проточной цитометрии. Через день после получения последней дозы животных подвергали эвтаназии и ткани собирали и готовили для гистопатологического исследования и для иммуногистохимического исследования (ИНС).

Фармакокинетический анализ концентраций 7A5-7D12var8-Fc в крови обработанных животных (измеренных в ELISA, фигура 18) показал, что антитело демонстрировало подобную IgG РК с периодом полужизни, который находился в диапазоне от 84 до 127 часов. У животного, которому вводили дозу, составляющую 1 мг/кг, антитело демонстрировало более короткий период полужизни после третьей инъекции, что может быть следствием возможного ответа антитела к лекарственному средству (ADA) у того животного.

Обнаруженные значения клиренса составляли от 0,36 до 0,72 мл/ч./кг, а объем распределения составлял от 58,5 до 115,2 мл/кг. Системное воздействие увеличивалось пропорционально дозе от 1 до 23 мг/кг. Однако не наблюдалось накопление после введения многократных доз.

Соединение можно было выявлять с помощью ИНС в различных тканях (лимфатическом узле, мышцах, коже и толстой кишке); как и ожидалось, интенсивность окрашивания соединения в этих тканях являлась пропорциональной дозе (данные не показаны). В проточном цитометрическом анализе клеток крови было показано несколько случаев временного снижения количества лимфоцитов (фигура 19), которые часто наблюдались в такого рода исследованиях многократных доз и которые являются связанными с процедурой. На фигуре 19 показаны случаи временного снижения количества Т-клеток в каждый момент времени через 2 часа после введения дозы. Однако количество Т-клеток возвращалось к исходным уровням через два дня после инъекции.

Напротив, V γ 9-положительные Т-клетки уменьшались в количестве в периферической крови и не восстановили свое прежнее количество. Эти клетки почти отсутствовали в ходе исследования, что демонстрирует специфический фармакодинамический эффект соединения. Измерения уровня цитокинов в крови обработанных животных показали, что обработка вызывала очень незначительное высвобождение цитокинов и что это почти исключительно ограничивалось первой инъекцией соединения. На фигуре 20 показаны уровни IL-6, измеренные в качестве примера.

В качестве общего заключения, обработка NHP с помощью 7A5-7D12var8-Fc очень хорошо переносилась и не демонстрировала клинических признаков токсичности. В дополнение, при гистопатологическом исследовании не было отмечено ни макроскопических, ни микроскопических аберраций ни в одном из исследованных органов (данные не показаны). Для сравнения: ViTE к EGFR x CD3 являлся смертельным для NHP в дозе, составляющей 31 мкг/кг/день непрерывной инфузии (Lutterbuese et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010: 107(28), 12605).

Формула изобретения

1. Антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать человеческую V δ 2, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3.

2. Антитело по п. 1, где

- X₁ в SEQ ID NO:1 представляет собой S (Ser) и X₂ в SEQ ID NO:3 представляет собой F (Phe) или
- X₁ в SEQ ID NO:1 представляет собой S (Ser) и X₂ в SEQ ID NO:3 представляет собой S (Ser).

3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где первая антигенсвязывающая область содержит:

- последовательность, представленную под SEQ ID NO:4, или
- последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, как, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности, представленной под SEQ ID NO:4, или состоит из них.

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело дополнительно содержит вторую антигенсвязывающую область и где вторая антигенсвязывающая область предпочтительно представляет собой однодоменное антитело.

6. Антитело по п. 4, где антитело представляет собой биспецифическое антитело.

7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и где вторая антигенсвязывающая область способна связывать человеческий EGFR.

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и где вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:5, последовательность CDR2,

представленную под SEQ ID NO:6, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:7, и

где предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит:

- последовательность, представленную под SEQ ID NO:8, или
- последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, как, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности, представленной под SEQ ID NO:8, или состоит из них.

9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и где первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:1, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:2, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:3, и где вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1, представленную под SEQ ID NO:5, последовательность CDR2, представленную под SEQ ID NO:6, и последовательность CDR3, представленную под SEQ ID NO:7.

10. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело способно опосредовать уничтожение человеческих клеток, экспрессирующих EGFR.

11. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область ковалентно связаны пептидным линкером.

12. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело дополнительно содержит домен, обеспечивающий увеличение периода полужизни, такой как Fc-область.

13. Антитело по любому из пп. 5—10, где антитело содержит Fc-область, где Fc-область представляет собой гетеродимер, содержащий два Fc-полипептида, где первая антигенсвязывающая область слита с первым Fc-полипептидом и вторая антигенсвязывающая область слита со вторым Fc-полипептидом, и где первый и второй Fc-полипептиды содержат асимметричные мутации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимеров, а не образованию гомодимеров.

14. Антитело по п. 13, где области CH3 Fc-полипептидов содержат указанные асимметричные мутации аминокислот, при этом предпочтительно первый Fc-полипептид содержит замену T366W и второй Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V или наоборот, где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии

с системой EU-нумерации.

15. Антитело по любому из пп. 12—14, где первый и второй Fc-полипептиды содержат мутацию в положении 234 и/или 235, при этом предпочтительно первый и второй Fc-полипептиды содержат замену L234F и L235E, где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой EU-нумерации.

16. Антитело по любому из пп. 12—15, где антитело содержит вторую антигенсвязывающую область и где первая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:4, вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:8, и

- первый Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:11, и второй Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:12, или

- первый Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:11, и второй Fc-полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:12.

17. Антитело по любому из пп. 12—16, где антитело содержит последовательности, представленные под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17, или состоит из них или содержит последовательности, представленные под SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:18, или состоит из них.

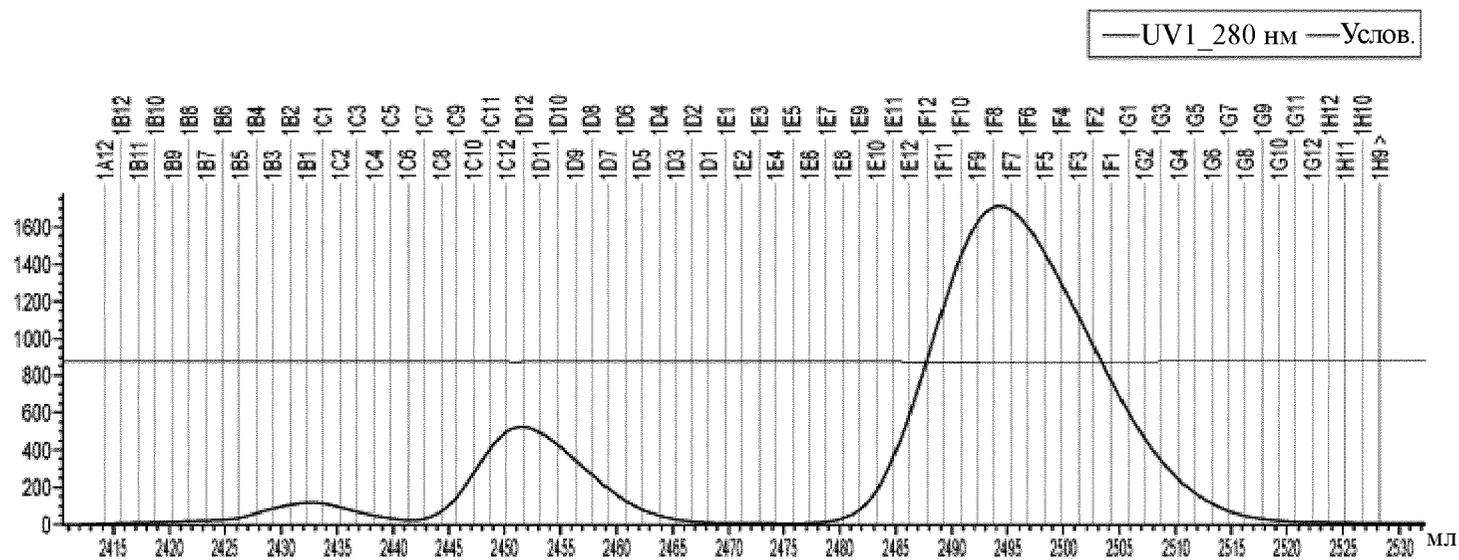
18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

19. Антитело по любому из пп. 1—17 для применения в качестве лекарственного препарата, предпочтительно для применения в лечении рака.

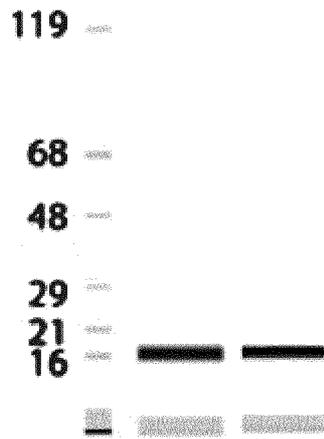
20. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп. 1—17, вектор экспрессии, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, или клетка-хозяин, содержащая одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело по любому из пп. 1—17.

21. Способ изготовления антитела, не предусматривающий сульфатирование тирозина, включающий экспрессию одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело по любому из пп. 1—17 в клетке-хозяине, где клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку яичника китайского хомячка, клетку эмбриональной почки человека или клетку *Pichia pastoris*.

Фиг. 1

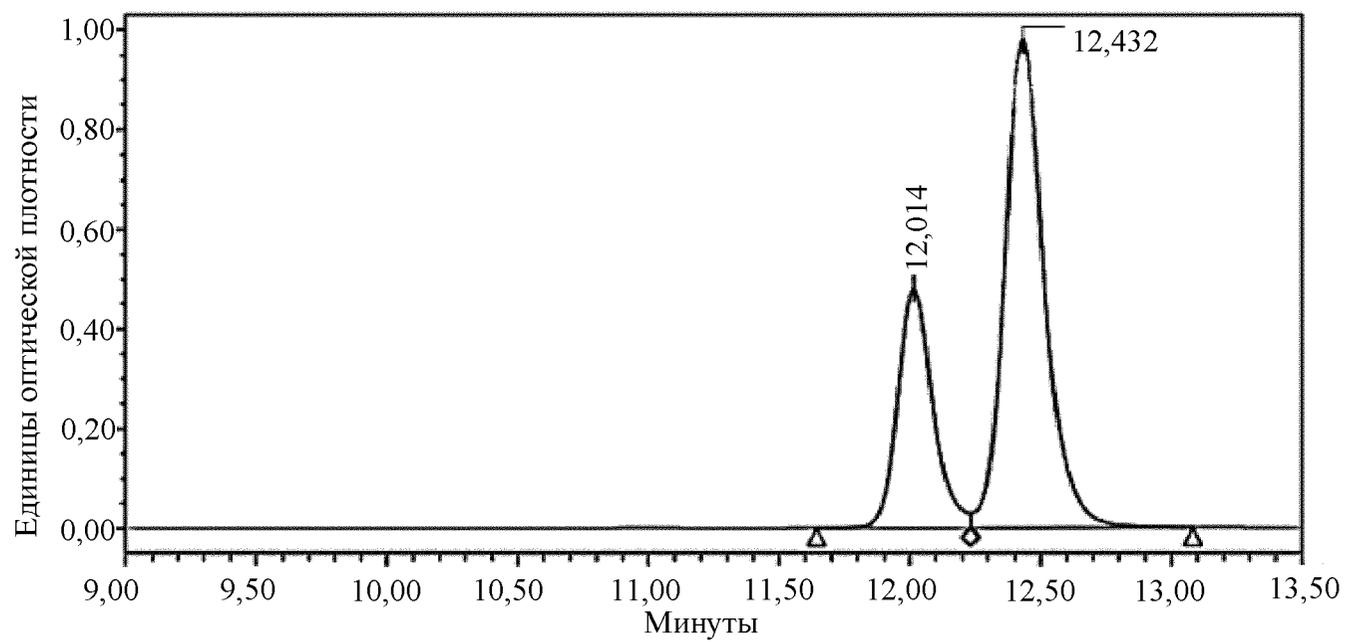


Фиг. 2



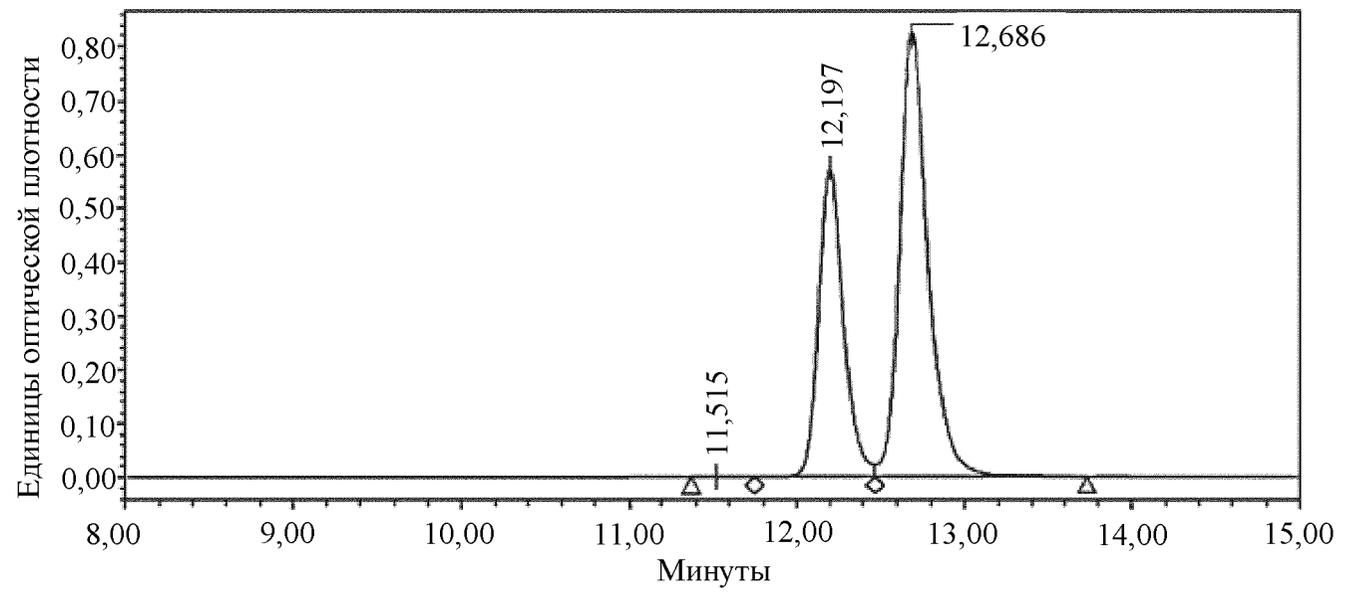
Фиг. 3А

Автоматически масштабируемая хроматограмма



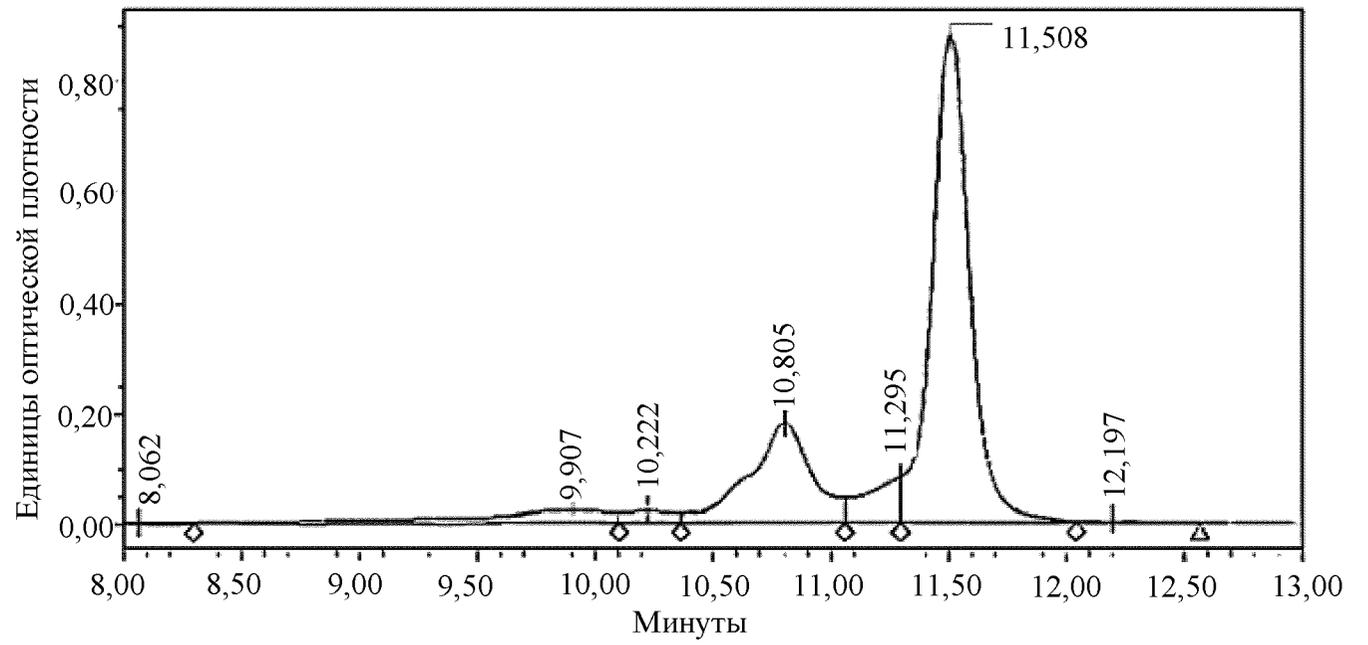
Фиг. 3В

Автоматически масштабируемая хроматограмма



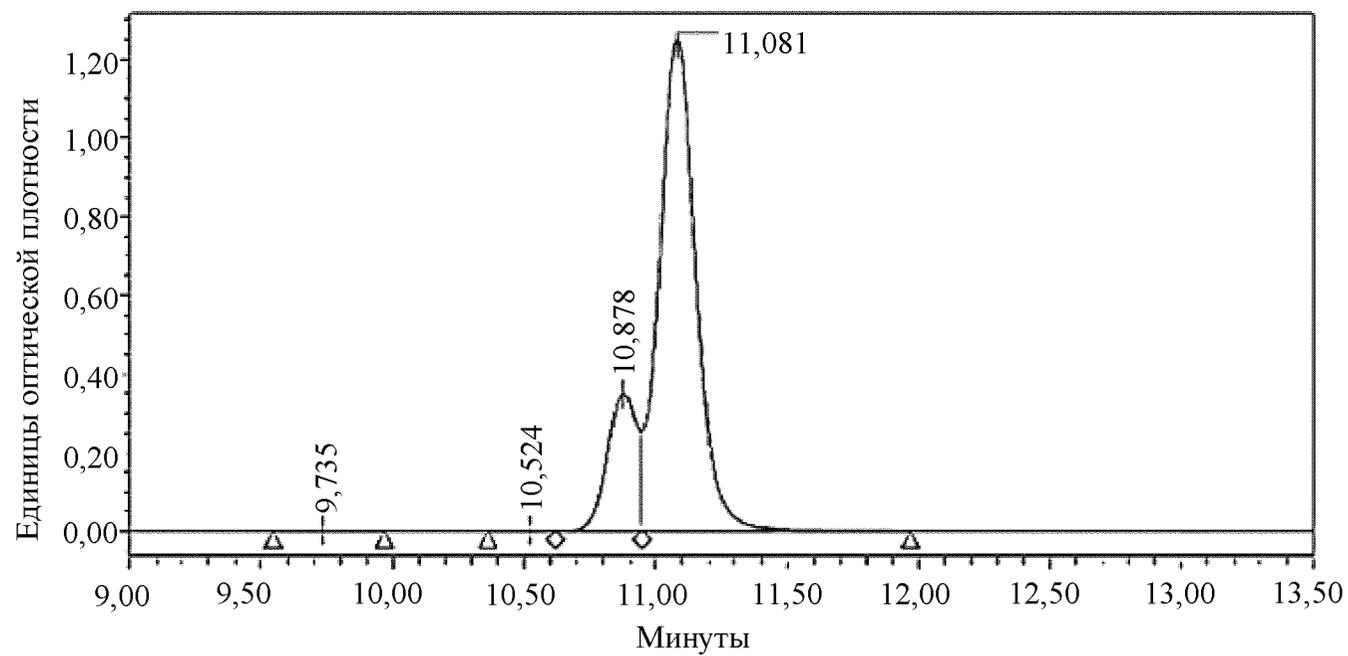
Фиг. 4А

Автоматически масштабируемая хроматограмма

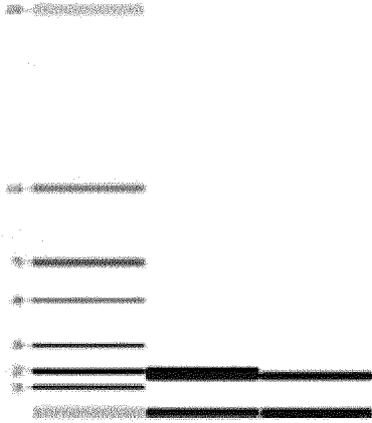


Фиг. 4В

Автоматически масштабируемая хроматограмма

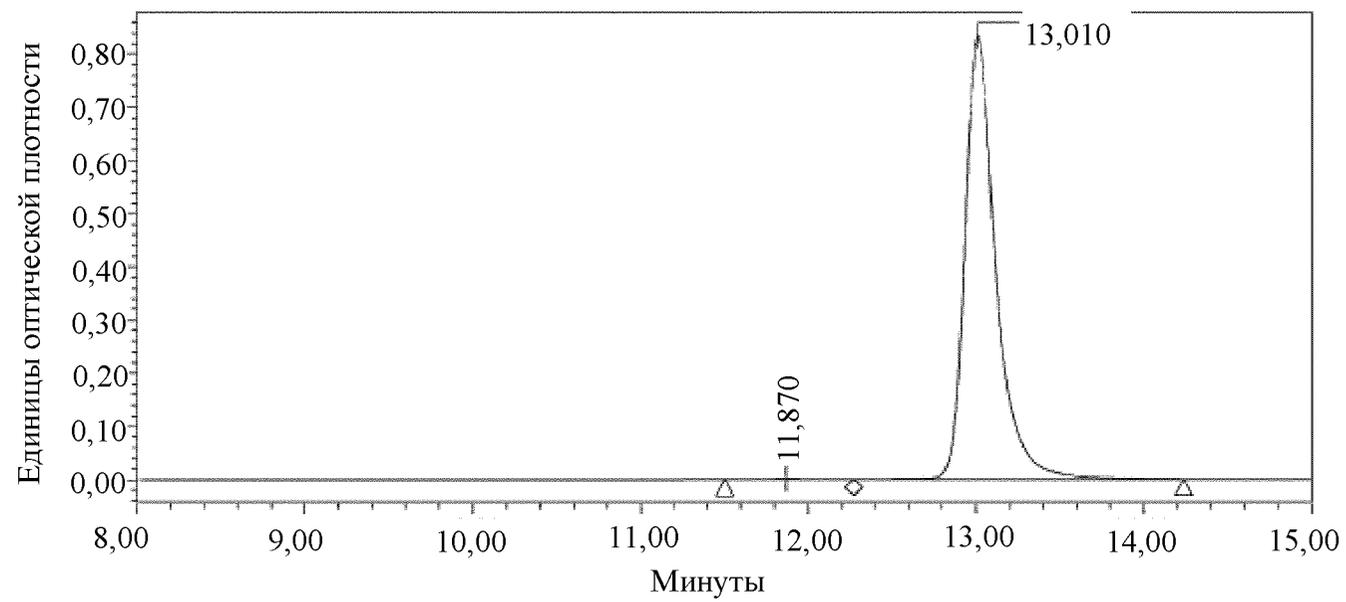


Фиг. 5



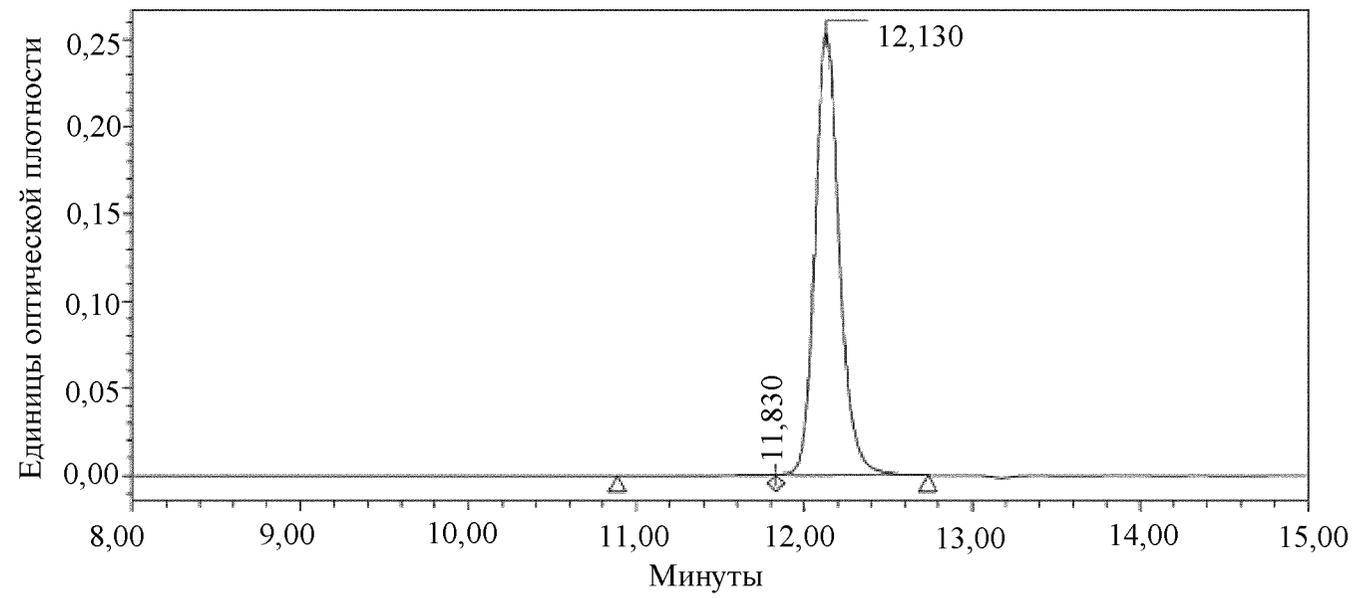
Фиг. 6А

Автоматически масштабируемая хроматограмма



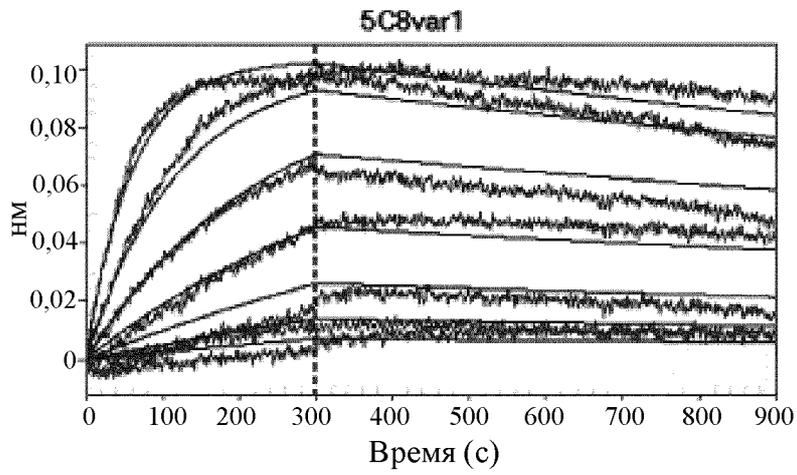
Фиг. 6В

Автоматически масштабируемая хроматограмма

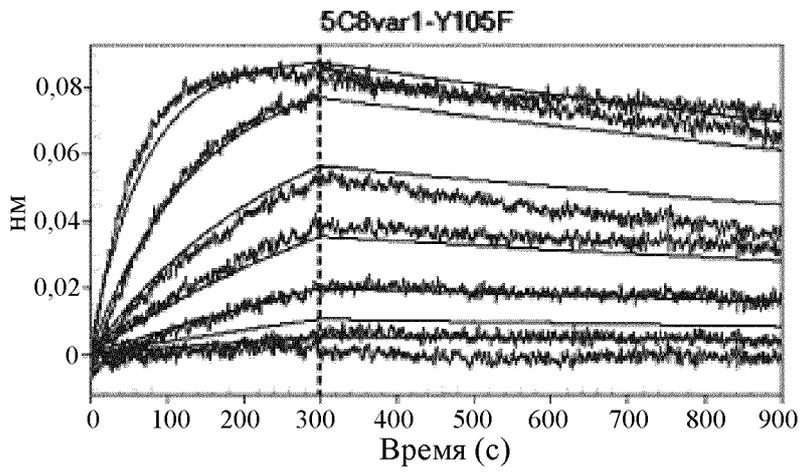


Фиг. 7

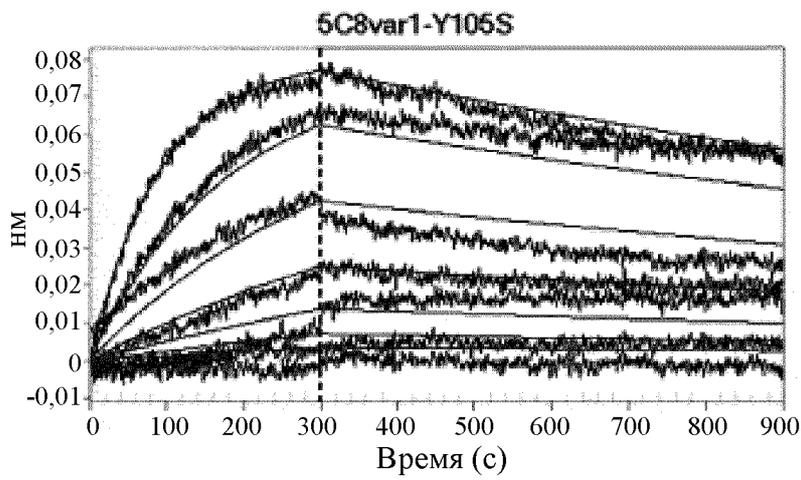
А



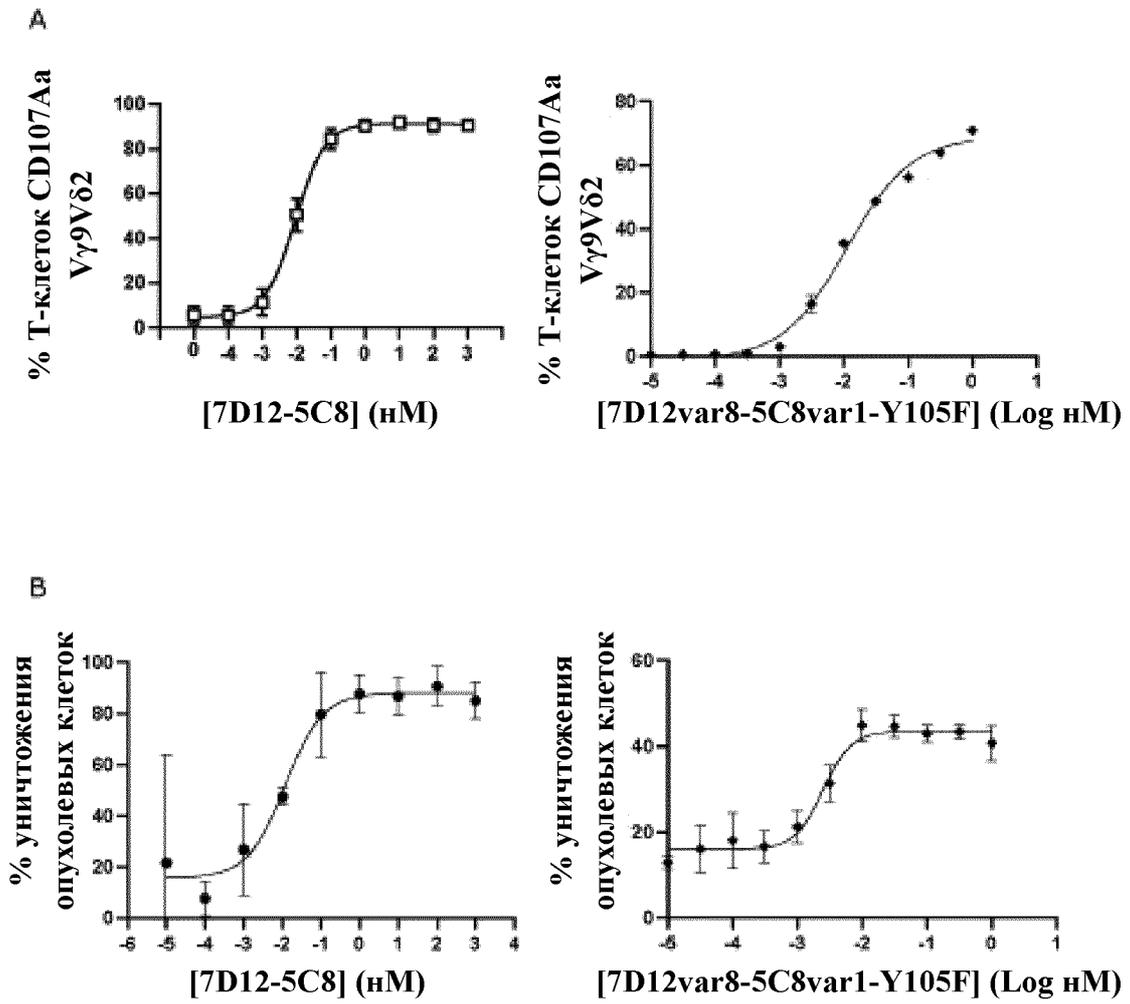
Б



С

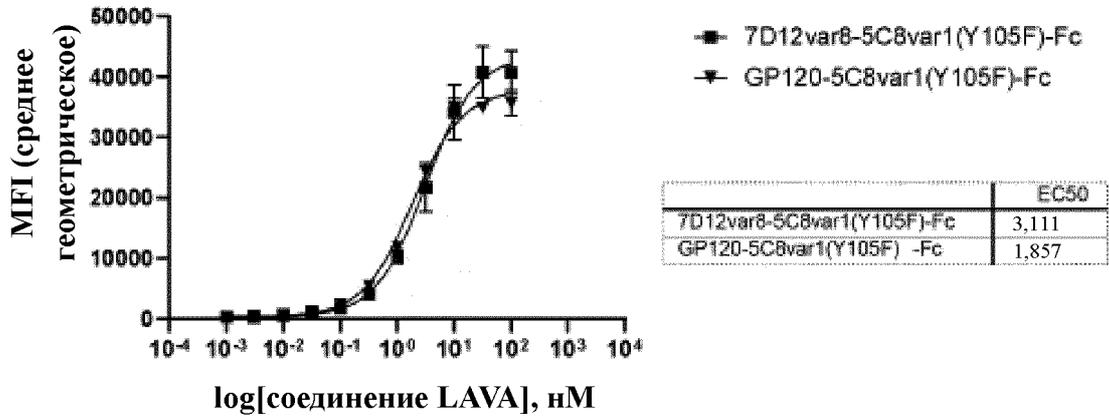


Фиг. 8

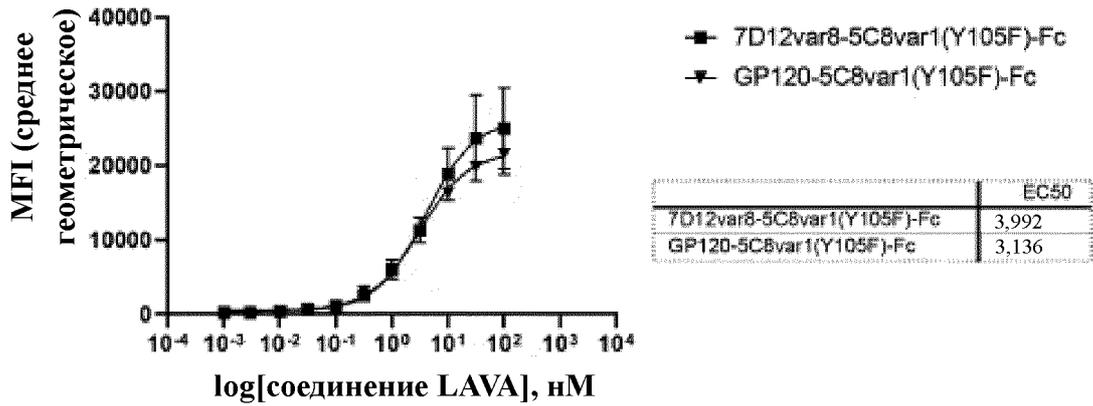


Фиг. 9

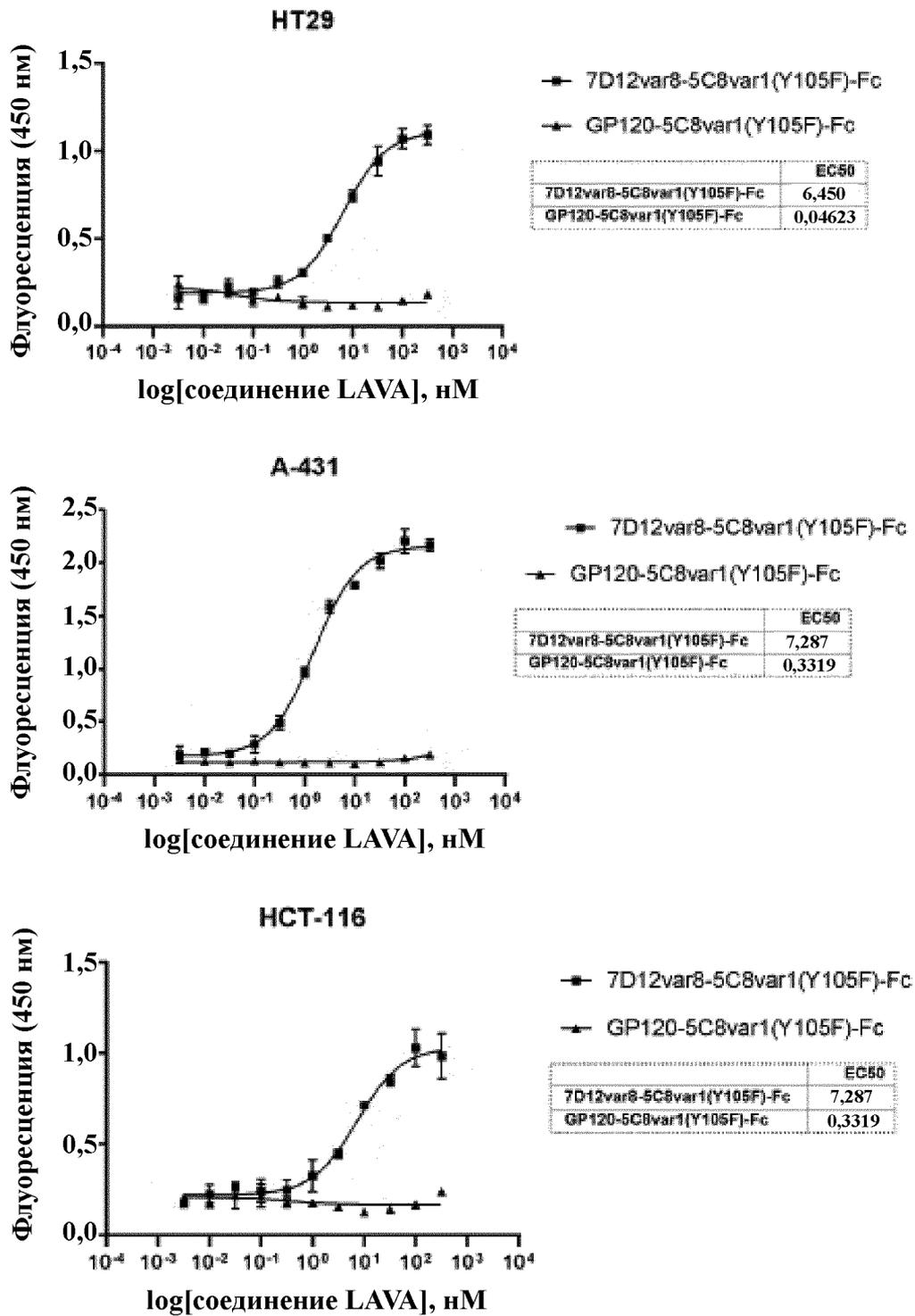
Связывание с D336 P3



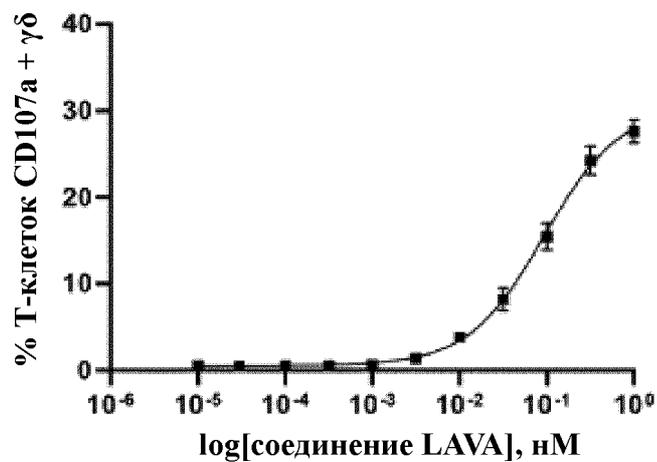
Связывание с D339 P2



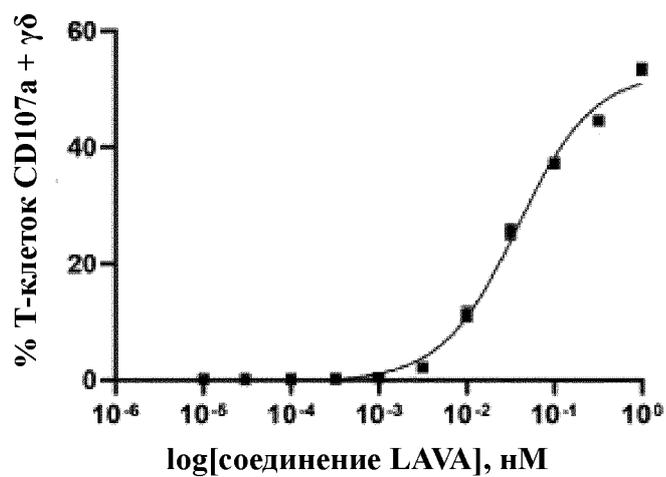
Фиг. 10



Фиг. 11

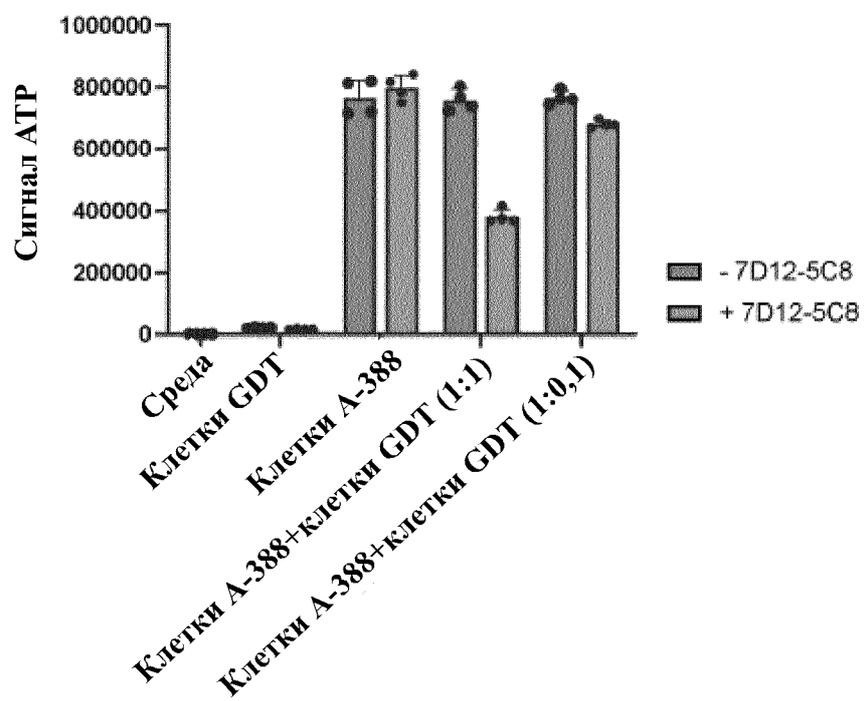
Дегрануляция $\gamma\delta$ Т-клеток из D339 P2

	EC50
7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc	0,09332

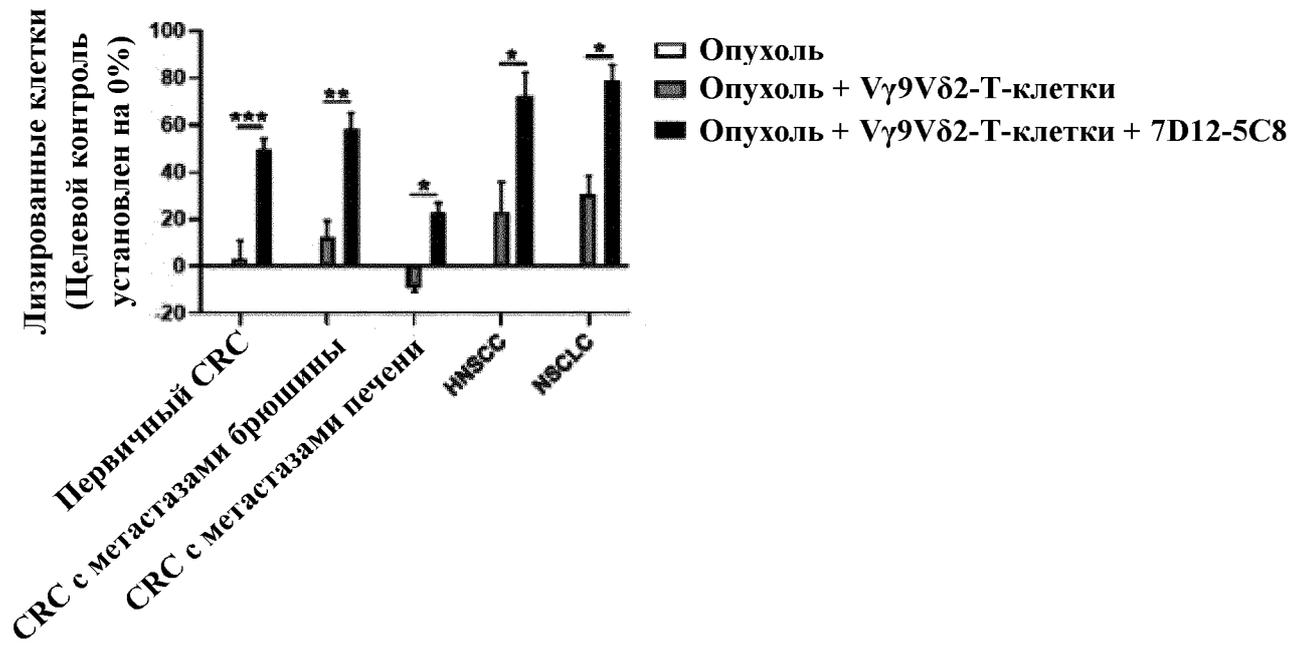
Дегрануляция $\gamma\delta$ Т-клеток из D336 P3

	EC50
7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc	0,03823

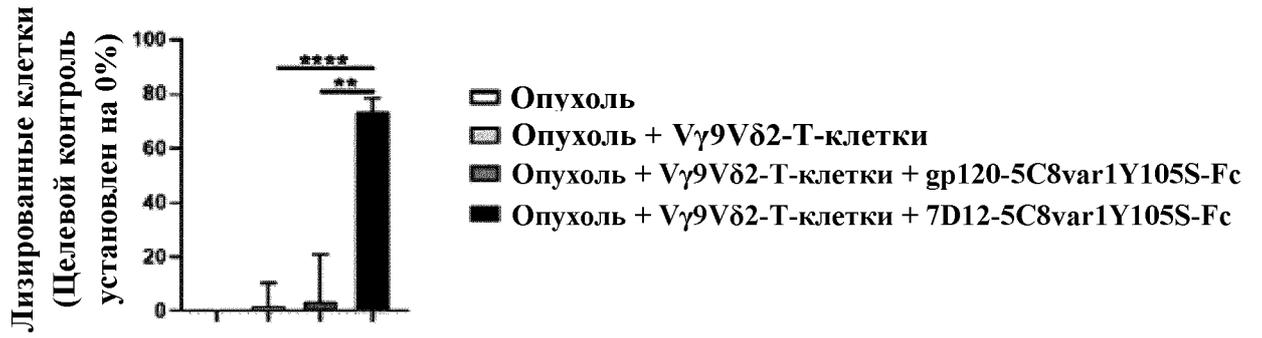
Фиг. 12



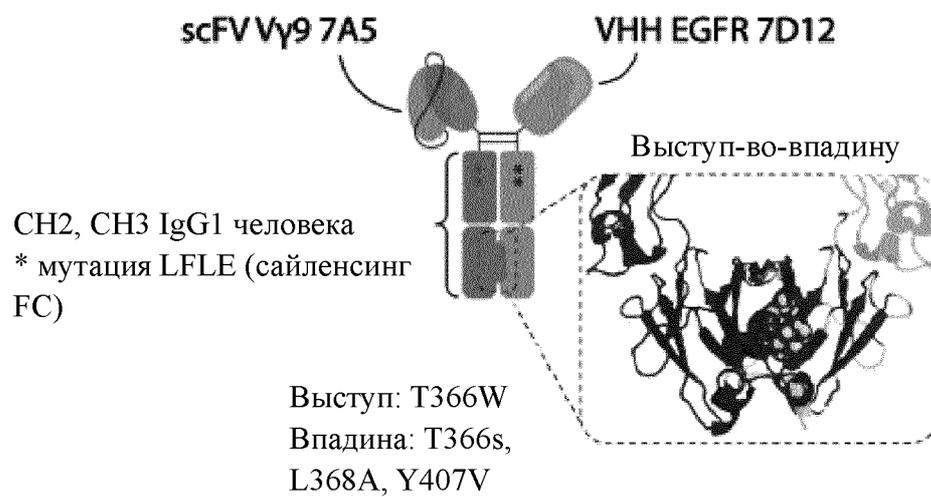
Фиг. 13



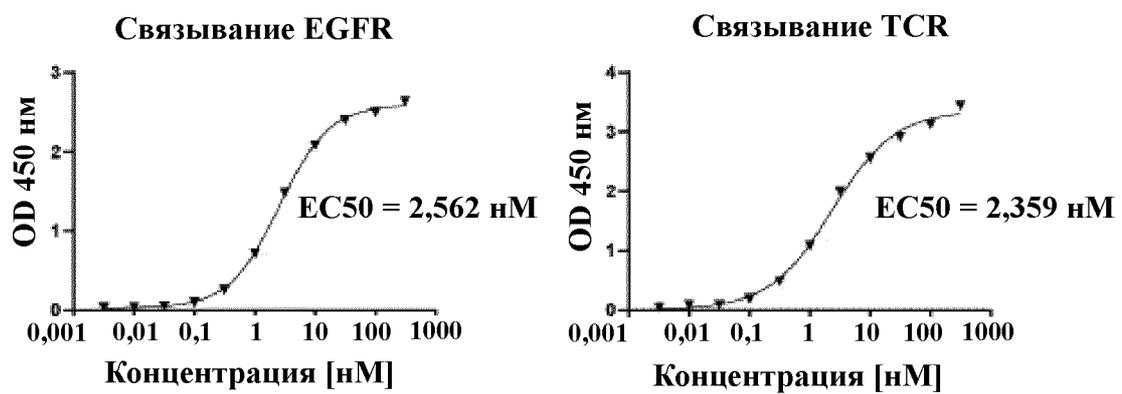
Фиг. 14



Фиг. 15

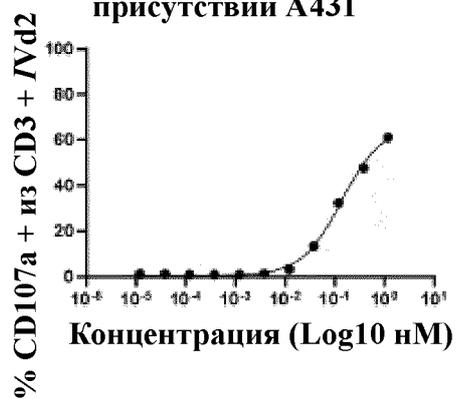


Фиг. 16

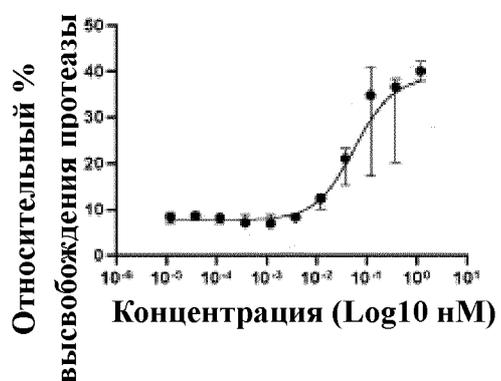


Фиг. 17

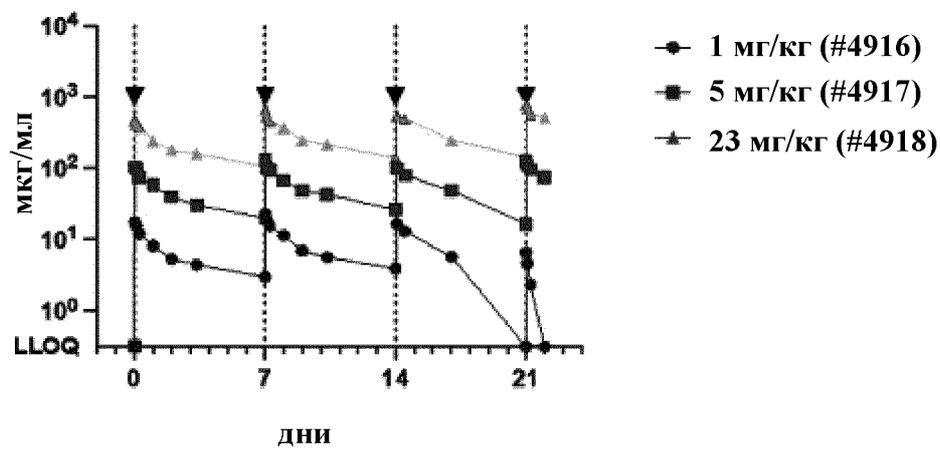
Дегрануляция $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии А431

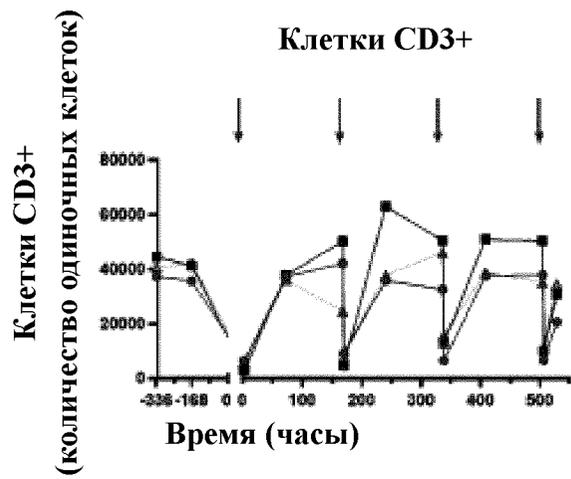


Опосредованная $\gamma\delta$ Т-клетками цитотоксичность А431

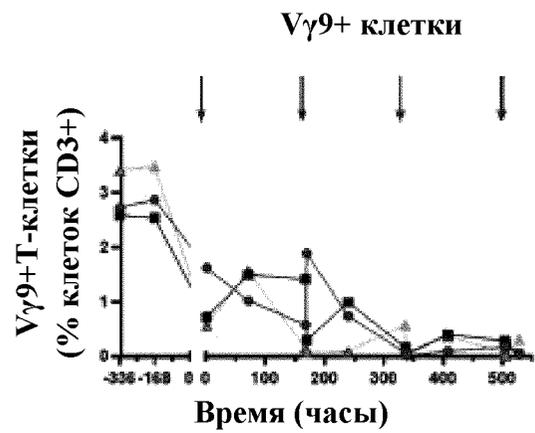


Фиг. 18





1 мг/кг
#4916
5 мг/кг
#4917
23 мг/кг
#4918



1 мг/кг
#4916
5 мг/кг
#4917
23 мг/кг
#4918

Фиг. 19

Фиг. 20

