

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391484** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.06**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.11.17**

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С АЛЬФА-РЕЦЕПТОРОМ ФОЛАТА**

---

(31) **63/115,436**

(32) **2020.11.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/059701**

(87) **WO 2022/109010 2022.05.27**

(71) Заявитель:  
**ТЕНЕОБИО, ИНК. (US)**

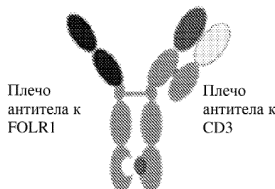
(72) Изобретатель:  
**Аванцино Брайан, Харрис Кэтрин,  
Кем Ханнес, Тринклейн Натан (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Раскрыты антитела на основе тяжелых цепей к альфа-рецептору фолата (FOLR1) (например, UniAbs™) вместе со способами получения таких антител, композициями, в том числе фармацевтическими композициями, содержащими такие антитела, и их применением для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией альфа-рецептора фолата (FOLR1).

В.



**A1**

**202391484**

**202391484**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578083EA/019

### АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С АЛЬФА-РЕЦЕПТОРОМ ФОЛАТА

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Для данной заявки испрашивается приоритет даты подачи предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/115436, поданной 18 ноября 2020 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Настоящее изобретение относится к человеческим антителам на основе тяжелых цепей (например, UniAbs<sup>TM</sup>), связывающимся с альфа-рецептором фолата (FOLR1). Настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения таких антител, композиций, в том числе фармацевтических композиций, содержащих такие антитела, и их применению для лечения нарушений, которые характеризуются экспрессией FOLR1.

#### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

##### Альфа-рецептор фолата (FOLR1)

[3] FOLR1, также известный как FR $\alpha$  (UniProt P15328; HGNC ID 3791), представляет собой гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанный мембранный белок, который связывается с фолатом и восстановленными производными фолиевой кислоты и опосредует внутриклеточную доставку 5-метилтетрагидрофолата. FOLR1 содержит внеклеточный домен (ECD) из 210 аминокислот, который характеризуется высокой аффинностью к фолату при нейтральном pH. После интернализации кислый pH вызывает конформационные изменения FOLR1, которые снижают аффинность FOLR1 к фолату, опосредуя высвобождение фолата с последующим возвратом FOLR1 на клеточную поверхность. Wibowo AS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Sep 17;110(38):15180-8. FOLR1 сверхэкспрессируется во многих типах солидных опухолей, включая опухоли яичника, молочной железы, легкого, почки, толстой кишки и головного мозга, однако экспрессия FOLR1 в нормальных здоровых тканях, таких как почка, легкое, сетчатка и головной мозг, ограничена апикальной поверхностью эпителия, что снижает их контакт в кровотоке со средствами, нацеливающимися на FOLR1, и делает FOLR1 перспективной терапевтической мишенью. Cheung A et al. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):52553-52574. FOLR1 также может быть применимым для визуализации и диагностики FOLR1-положительных опухолей, и, более того, сообщается, что растворимый FOLR1 повышен у пациентов с карциномами яичника. Kurosaki A et al. Int J Cancer. 2016 Apr 15;138(8):1994-2002. Описано несколько моноклональных антител, конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и конъюгатов на основе фолата, специфичных к FOLR1. Cheung A et al. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):52553-52574. Кроме того, для лечения рака яичника исследуются Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR), специфичными к

FOLR1. Kershaw MH et al. Clin Cancer Res. 2006 Oct; 12:6106-15; Song DG et al. Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4617-27.

#### Антитела на основе тяжелых цепей

[4] В обычном антителе, представляющем собой IgG, ассоциация тяжелой цепи и легкой цепи частично обусловлена гидрофобным взаимодействием между константной областью легкой цепи и константным доменом CH1 тяжелой цепи. Существуют дополнительные остатки в каркасной области 2 (FR2) и каркасной области 4 (FR4) тяжелой цепи, которые также участвуют в этом гидрофобном взаимодействии между тяжелой и легкой цепями.

[5] Однако известно, что сыворотка крови верблюдовых (подотряд Tylopoda, который включает верблюдов, дромедаров и лам) содержит основной тип антител, состоящих исключительно из парных H-цепей (только тяжелых цепей антител или UniAbs<sup>TM</sup>). UniAbs<sup>TM</sup> Camelidae (Camelus dromedarius, Camelus bactrianus, Lama glama, Lama guanaco, Lama alpa и Lama vicugna) характеризуются уникальной структурой, состоящей из единственного переменного домена (VH), шарнирной области и двух константных доменов (CH2 и CH3), которые являются высокомолекулярными доменами CH2 и CH3 классических антител. Данные UniAbs<sup>TM</sup> характеризуются отсутствием первого домена константной области (CH1), который присутствует в геноме, но подвергается сплайсингу во время процессинга mRNA. Отсутствие домена CH1 объясняет отсутствие легкой цепи в UniAbs<sup>TM</sup>, так как этот домен представляет собой место закоривания константного домена легкой цепи. Такие UniAbs<sup>TM</sup> естественным образом эволюционировали так, чтобы придать антигенсвязывающую специфичность и высокую аффинность посредством трех CDR от обычных антител или их фрагментов (Muyldermans, 2001; J Biotechnol 74:277-302; Revets et al., 2005; Expert Opin Biol Ther 5:111-124). Хрящевые рыбы, такие как акулы, также выработали особый тип иммуноглобулина, обозначаемый как IgNAR, который характеризуется отсутствием легких полипептидных цепей и полностью состоит из тяжелых цепей. Молекулы IgNAR можно подвергать манипуляциям посредством молекулярной инженерии для получения переменного домена единственного полипептида тяжелой цепи (vNAR) (Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004); Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)).

[6] Способность антител, содержащих только тяжелые цепи и не содержащих легкую цепь, связывать антиген была установлена в 1960-х гг. (Jaton et al. (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195). Тяжелая цепь иммуноглобулина, физически отделенная от легкой цепи, сохраняла 80% антигенсвязывающей активности по сравнению с тетрамерным антителом. Sitia et al. (1990) Cell, 60, 781-790 продемонстрировали, что удаление домена CH1 из реаранжированного мышинового гена  $\mu$  приводит к продуцированию антитела, содержащего только тяжелые цепи, не содержащего легкую цепь, в культуре клеток млекопитающего. Продуцируемые антитела сохраняли специфичность связывания VH и эффекторные функции.

[7] Антитела на основе тяжелых цепей с высокой специфичностью и аффинностью могут быть получены к различным антигенам посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), и часть VHH можно легко клонировать и экспрессировать в дрожжах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)).

[8] Мыши, у которых локус легкой (L) цепи  $\lambda$  (лямбда) и/или локусы L цепи  $\lambda$  и  $\kappa$  (каппа) были функционально подвергнуты сайленсингу, и антитела, продуцируемые такими мышами, описаны в патентах США №№ 7541513 и 8367888. О рекомбинантном продуцировании антител, содержащих только тяжелые цепи, у мышей и крыс сообщалось, например, в WO 2006008548; публикации заявки США № 20100122358; Nguyen et al., 2003, *Immunology*; 109(1), 93-101; Brüggemann et al., *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90; и Zou et al., 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283. Получение крыс, характеризующихся нокаутом, посредством микроинъекций нуклеаз с цинковыми пальцами в эмбрион описано в Geurts et al., 2009, *Science*, 325(5939):433. Растворимые антитела, содержащие только тяжелые цепи, и трансгенные грызуны, содержащие гетерологичный локус тяжелых цепей, продуцирующие такие антитела, описаны в патентах США №№ 8883150 и 9365655. Структуры CAR-T, содержащие однодоменные антитела в качестве связывающего (нацеливающегося) домена, описаны, например, в Iri-Sofla et al., 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641, и Jamnani et al., 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378-386.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[9] Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам на основе тяжелых цепей, в том числе без ограничения UniAbs<sup>TM</sup> с аффинностью связывания к FOLR1. Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения таких антител, композициям, содержащим такие антитела, и их применению для лечения нарушений, которые характеризуются экспрессией FOLR1.

[10] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) CDR1, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1-5; и/или (b) CDR2, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 6-17; и/или (c) CDR3, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 18-22.

[11] В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит вторую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) CDR1, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1-5; и/или (b) CDR2, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 6-17; и/или (c) CDR3, имеющую две или меньше

замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 18-22.

[12] В некоторых вариантах осуществления указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в человеческой каркасной области. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

[13] В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

[14] В некоторых вариантах осуществления вторая переменная область тяжелой цепи содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

[15] В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

[16] В некоторых вариантах осуществления вторая переменная область тяжелой цепи содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

[17] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 или (b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20.

[18] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 23-74. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-74. В некоторых вариантах осуществления последовательность переменной области тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 72.

[19] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие первую переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a)

последовательность CDR1 формулы: G F X1 F X2 S X3 X4 (SEQ ID NO: 75), где: X1 представляет собой N, T, I или S; X2 представляет собой R или S; X3 представляет собой F или Y; и X4 представляет собой G, S или T; и (b) последовательность CDR2 формулы: I S S X1 S X2 X3 I (SEQ ID NO: 76), где: X1 представляет собой G или S; X2 представляет собой S или T; и X3 представляет собой Y, D, T или S; и (c) последовательность CDR3 формулы: A R D V T S G I A A A G X1 A F N I (SEQ ID NO: 77), где: X1 представляет собой A или S, в моновалентном или бивалентном формате.

[20] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие первую переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1 формулы: G F X1 F S S Y S (SEQ ID NO: 78), где: X1 представляет собой S или T; и (b) последовательность CDR2 формулы: I X1 X2 S S X3 X4 I (SEQ ID NO: 79), где: X1 представляет собой S, T или D; X2 представляет собой S, R или G; X3 представляет собой D или S; и X4 представляет собой T или I; и (c) последовательность CDR3 формулы: A X1 V G L X2 F D Y (SEQ ID NO: 80), где: X1 представляет собой S или T; и X2 представляет собой D или E, в моновалентном или бивалентном формате.

[21] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие первую переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1 формулы: G F X1 F X2 S X3 X4 (SEQ ID NO: 75), где: X1 представляет собой N, T, I или S; X2 представляет собой R или S; X3 представляет собой F или Y; и X4 представляет собой G, S или T; и (b) последовательность CDR2 формулы: I S S X1 S X2 X3 I (SEQ ID NO: 76), где: X1 представляет собой G или S; X2 представляет собой S или T; и X3 представляет собой Y, D, T или S; и (c) последовательность CDR3 формулы: A R D V T S G I A A A G X1 A F N I (SEQ ID NO: 77), где: X1 представляет собой A или S; и вторую переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1 формулы: G F X1 F S S Y S (SEQ ID NO: 78), где: X1 представляет собой S или T; и (b) последовательность CDR2 формулы: I X1 X2 S S X3 X4 I (SEQ ID NO: 79), где: X1 представляет собой S, T или D; X2 представляет собой S, R или G; X3 представляет собой D или S; и X4 представляет собой T или I; и (c) последовательность CDR3 формулы: A X1 V G L X2 F D Y (SEQ ID NO: 80), где: X1 представляет собой S или T; и X2 представляет собой D или E.

[22] В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к N-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к C-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи.

[23] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR содержат последовательность, имеющую две или меньше замены в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

[24] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

[25] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH.

[26] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

[27] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

[28] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

[29] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с FOLR1, содержащие первую переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH; и вторую переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

[30] В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к N-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к C-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело является мультиспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело является биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания с белком CD3 и белком FOLR1. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания с двумя разными эпитопами на одном и том же белке FOLR1. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания

с эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания с Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело характеризуется аффинностью связывания с CD3. В некоторых вариантах осуществления антитело представлено в формате CAR-T.

[31] Аспекты настоящего изобретения включают биспецифические антитела, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH.

[32] Аспекты настоящего изобретения включают биспецифические антитела, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

[33] Аспекты настоящего изобретения включают биспецифические антитела, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

[34] Аспекты настоящего изобретения включают биспецифические антитела, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83,



последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

[35] Аспекты настоящего изобретения включают мультиспецифические антитела, содержащие: (i) переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88, в каркасной области человеческой VL; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, где антигенсвязывающий домен содержит первую и вторую антигенсвязывающие области в бивалентной конфигурации, где: первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

[36] В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область расположена ближе к N-концу относительно второй антигенсвязывающей области. В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область расположена ближе к C-концу относительно второй антигенсвязывающей области. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая антигенсвязывающие области антигенсвязывающего домена антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 соединены полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой линкер GS. В некоторых вариантах осуществления линкер GS состоит из последовательности под SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82.

[37] Аспекты настоящего изобретения предусматривают фармацевтические композиции, содержащие антитело, описанное в данном документе.

[38] Аспекты настоящего изобретения включают способы лечения нарушения, характеризующегося экспрессией FOLR1, включающие введение субъекту с указанным нарушением антитела или фармацевтической композиции, описанных в данном документе.

[39] Аспекты настоящего изобретения включают применение антитела, описанного в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения нарушения,

характеризующегося экспрессией FOLR1.

[40] Аспекты настоящего изобретения включают антитело, описанное в данном документе, для применения в лечении нарушения, характеризующегося экспрессией FOLR1.

[41] В некоторых вариантах осуществления нарушение выбрано из группы, состоящей из рака яичника, форм рака матки, рака легкого, рака почки, колоректального рака, рака молочной железы и рака головного мозга.

[42] Аспекты настоящего изобретения включают полинуклеотиды, кодирующие описанное в данном документе антитело, векторы, содержащие такие полипептиды, и клетки, содержащие такие векторы.

[43] Аспекты настоящего изобретения предусматривают способы получения антитела, описанного в данном документе, включающие выращивание клетки, описанной в данном документе, в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела и выделение антитела из клетки.

[44] Аспекты настоящего изобретения включают способы получения антитела, описанного в данном документе, включающие иммунизацию животного UniRat белком FOLR1 и идентификацию последовательностей FOLR1-связывающих антител.

[45] Аспекты настоящего изобретения включают способы лечения, включающие введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективной дозы антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[46] Эти и другие аспекты будут дополнительно объяснены в остальной части настоящего изобретения, в том числе примерах.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[47] На фиг. 1, панелях А-Е, представлена серия графиков, на которых показаны результаты связывания антитела HCAb к FOLR1 с FOLR1-положительными линиями клеток.

[48] На фиг. 2, панелях А-В, представлена серия графиков, на которых показаны результаты связывания антитела HCAb к FOLR1 с FOLR2- и IZUMO1R-положительными линиями клеток.

[49] На фиг. 3, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых показаны результаты опосредованного моновалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток. На панели А изображены уровни специфического лизиса опухолевых клеток, на панели В изображено высвобождение IL-2, а на панели С изображено высвобождение IFN $\gamma$ . Панель D представляет собой иллюстрацию моновалентного биспецифического антитела.

[50] На фиг. 4, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых показаны результаты опосредованного моновалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток. На панели А изображены уровни специфического лизиса опухолевых клеток, на

панели В изображено высвобождение IL-2, а на панели С изображено высвобождение IFN $\gamma$ . Панель D представляет собой иллюстрацию моновалентного биспецифического антитела.

[51] На фиг. 5, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых показаны результаты опосредованного бивалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток. На панели А изображены уровни специфического лизиса опухолевых клеток, на панели В изображено высвобождение IL-2, а на панели С изображено высвобождение IFN $\gamma$ . Панель D представляет собой иллюстрацию бивалентного биспецифического антитела.

[52] На фиг. 6, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых показаны результаты опосредованного бивалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток. На панели А изображены уровни специфического лизиса опухолевых клеток, на панели В изображено высвобождение IL-2, а на панели С изображено высвобождение IFN $\gamma$ . Панель D представляет собой иллюстрацию бивалентного биспецифического антитела.

[53] На фиг. 7, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых показаны результаты опосредованного бивалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток HT-29 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток. На панели А изображены уровни специфического лизиса опухолевых клеток, на панели В изображено высвобождение IL-2, а на панели С изображено высвобождение IFN $\gamma$ . Панель D представляет собой иллюстрацию бивалентного биспецифического антитела.

[54] На фиг. 8, панели А, представлен график, на котором показаны результаты опосредованного бивалентными биспецифическими антителами цитолиза человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток при варьирующих соотношениях эффектора и мишени. Панель В представляет собой иллюстрацию бивалентного биспецифического антитела.

[55] На фиг. 9 представлен график, на котором изображены результаты фармакокинетического исследования однократной дозы на мышах.

[56] На фиг. 10, панели А, представлена схематическая диаграмма, на которой изображена мышинная ксенотрансплататная модель с использованием гуманизированных клеток IGROV-1. На панели В представлен график, на котором изображены результаты измерений объема опухоли в ответ на обработку указанным бивалентным биспецифическим антителом или контрольной средой-носителем.

[57] На фиг. 11 представлена таблица, демонстрирующая плотность экспрессии FOLR1 (FR $\alpha$ ) на нормальных и злокачественных клетках.

[58] На фиг. 12, панели А, представлена схематическая диаграмма для TNB-928B, которое представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с FOLR1 и

CD3.

[59] На фиг. 12, панели В, представлен график, на котором изображен связанный TNB-928В в зависимости от концентрации антител, что измерено на клетках IGROV-1, экспрессирующих FOLR1.

[60] На фиг. 12, панели С, представлен график, на котором показан лизис клеток (%) в зависимости от концентрации антител для указанных конструкций антител.

[61] На фиг. 13, панели А, представлены два графика, на которых показана активация CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток в зависимости от концентрации антител.

[62] На фиг. 13, панели В, представлены два графика, на которых показана пролиферация CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток в зависимости от концентрации антител.

[63] На фиг. 13, панели С, представлен график, на котором показана процентная доля Трег-клеток, индуцированных после обработки указанными конструкциями антител.

[64] На фиг. 14, панелях А-В, представлены графики, на которых показан лизис клеток (%) в зависимости от обработки указанными конструкциями антител.

[65] На фиг. 15 представлена серия графиков, на которых показан лизис клеток (%), продуцирование IFN $\gamma$  и продуцирование IL-2 для трех разных доноров.

[66] На фиг. 16, панелях А-Ф, представлена серия графиков, на которых показан лизис клеток (%) (панели А и С); плотность антигена FOLR1 (FR $\alpha$ ) для респондеров и не отвечающих (панель В); продуцирование цитокинов (панели D и E) и Трег-клетки (панель F).

[67] На фиг. 17, панелях А-С, представлена серия графиков, на которых обобщены данные, полученные при использовании мышинной модели ксенотрансплантата NCG. На панели А показан объем опухоли в зависимости от времени (дней исследования); на панели В обобщены данные иммуногистохимического анализа (ИНС) опухолей; и на панели С показана концентрация TNB-928В в сыворотке крови в зависимости от времени у BALB/с мышей без опухолей.

[68] На фиг. 18 представлена таблица, в которой обобщены биофизические характеристики TNB-928В.

[69] На фиг. 19 представлена таблица, в которой обобщены значения EC50 для перечисленных конструкций антител, полученные в результате описанных в данном документе анализов цитотоксичности.

[70] На фиг. 20 представлена таблица, в которой обобщены клинические и молекулярные характеристики свежих образцов опухолей яичников *ex vivo*, полученных от пациентов, обработанных посредством TNB-928В.

[71] На фиг. 21 представлены две хроматограммы SEC-UPLC TNB-928В, полученные после инкубации при 4°C и 37°C в течение одного месяца.

[72] На фиг. 22, панели А, представлена серия графиков, на которых показан лизис указанного типа опухолевых клеток при различных соотношениях Е:Т.

[73] На фиг. 22, панели В, представлен график, на котором показан лизис клеток в зависимости от концентрации TNB-928В.

[74] На фиг. 22, панели С, представлен график, на котором показана концентрация sFR $\alpha$  в супернатанте совместной культуры, измеренная с помощью ELISA.

[75] На фиг. 23, панели А, представлен график, на котором показана концентрация пепорина в зависимости от концентрации TNB-928В, полученная со свежедиссоциированной тканью карциномы яичника, инкубированной без добавления экзогенных РВМС. На панели В представлен график, на котором показана концентрация гранзима В в зависимости от концентрации TNB-928В, полученная со свежедиссоциированной тканью карциномы яичника, инкубированной без добавления экзогенных РВМС.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[76] В практике настоящего изобретения будут применяться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998) и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

[77] В случае, когда представлен диапазон значений, необходимо понимать, что каждое промежуточное значение до десятой единицы измерения нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхними и нижними пределами данного диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в данном указанном диапазоне, охвачено в настоящем изобретении. Верхние и нижние пределы этих указанных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также быть охвачены в настоящем изобретении, за исключением любого особым образом исключенного предела в указанном диапазоне. В случае, когда указанный диапазон включает один или оба из этих указанных пределов, диапазоны, исключаящие один или оба из указанных включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[78] Если не указано иное, остатки антител в данном документе пронумерованы в соответствии с системой нумерации согласно Kabat (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[79] В следующем описании представлены многочисленные конкретные детали для

обеспечения более полного понимания настоящего изобретения. Однако специалисту в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может быть реализовано на практике без одной или нескольких из этих конкретных деталей. В других случаях хорошо известные характеристики и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны в целях избежания затруднения понимания настоящего изобретения.

[80] Все ссылки, цитируемые во всем настоящем изобретении, в том числе заявки патент и публикации патента, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### I. Определения

[81] Под "содержащим" подразумевается, что перечисленные элементы требуются в композиции/способе/наборе, но другие элементы могут быть включены для образования композиции/способа/набора и т. п. в пределах объема формулы изобретения.

[82] Под "состоящим по сути из" подразумевается ограничение объема описанных композиции или способа конкретными материалами или стадиями, которые существенно не влияют на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявленного изобретения.

[83] Под "состоящим из" подразумевается исключение из композиции, способа или набора любого элемента, стадии или ингредиента, не указанных в формуле изобретения.

[84] Остатки антител по данному документу пронумерованы в соответствии с системой нумерации согласно Kabat и системой нумерации согласно EU. Система нумерации согласно Kabat обычно применяется при обозначении остатка в переменном домене (примерно остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации согласно EU" или "EU-индекс" обычно применяется при обозначении остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, EU-индекс, описанный в Kabat et al., см. выше). "EU-индекс согласно Kabat" относится к нумерации согласно EU остатков человеческого антитела IgG1. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в переменном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации согласно Kabat. Если в данном документе не указано иное, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации согласно EU.

[85] Антитела, также называемые иммуноглобулинами, обычно содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, где аминоконцевой домен тяжелой и легкой цепей является переменным по последовательности, поэтому его обычно называют доменом переменной области или переменным доменом тяжелой цепи (VH) или переменным доменом легкой цепи (VL). Два домена обычно связываются с образованием области специфического связывания, хотя, как будет обсуждаться в данном документе, специфическое связывание также может быть получено с переменными последовательностями, представленными только тяжелыми цепями, и множество не встречающихся в природе конфигураций антител известны и применяются в данной

области техники.

[86] "Функционально" или "биологически активное" антитело или антигенсвязывающая молекула (в том числе антитела, содержащие только тяжелые цепи, и мультиспецифические (например, биспецифические) трехцепочечные антителоподобные молекулы (ТСА, описанные в данном документе) могут характеризоваться одной или несколькими своими естественными видами активности в структурных, регуляторных, биохимических или биофизических явлениях. Например, функциональное антитело или другая связывающая молекула, например ТСА, может характеризоваться способностью специфически связывать антиген, и связывание в свою очередь может приводить к индукции или изменению клеточного или молекулярного явления, такого как передача сигнала или ферментативная активность. Функциональное антитело или другая связывающая молекула, например ТСА, может также блокировать активацию рецептора лигандом или действовать как агонист или антагонист. Способность антитела или другой связывающей молекулы, например, ТСА, характеризоваться одной или несколькими своими естественными видами активности зависит от нескольких факторов, в том числе правильной укладки и сборки полипептидных цепей.

[87] Термин "антитело" используется в данном документе в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мономеры, димеры, мультимеры, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела, содержащие только тяжелые цепи, трехцепочечные антитела, ТСА, одноцепочечные Fv (scFv), наноантитела и т. п., а также предусматривают фрагменты антител, если они характеризуются требуемой биологической активностью (Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов.

[88] Термин антитело может относиться к полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи, интактной молекуле иммуноглобулина или иммунологически активной части любого из таких полипептидов, т. е. полипептиду, который содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющей интерес, или ее части; такие мишени включают без ограничения раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин, раскрытый в данном документе, может относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекулы иммуноглобулина, в том числе сконструированным подклассам с измененными Fc-частями, которые характеризуются уменьшенной или усиленной активностью эффекторных клеток. Легкие цепи рассматриваемых антител могут представлять собой легкие цепи каппа (V-каппа-цепи) или легкие цепи лямбда (V-лямбда-цепи). Иммуноглобулины могут быть получены из любых видов. В одном аспекте иммуноглобулин преимущественно характеризуется человеческим происхождением.

[89] Термин "моноклональное антитело", применяемый в данном документе,

относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, идентичных, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела характеризуются высокой специфичностью и направлены против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов на основе антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена. Моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены посредством метода гибридом, впервые описанного Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, и также могут быть получены, например, посредством способов получения рекомбинантного белка (см., например, патент США № 4816567).

[90] Термин "вариабельный", применяемый в связи с антителами, относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов антител значительно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и проявления специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями, в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, в значительной степени принимающих конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру  $\beta$ -листа и в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости друг от друга посредством FR и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

[91] Термин "гипервариабельная область", применяемый в данном документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или такие остатки из остатков 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) "гипервариабельной петли" в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления "CDR" означает



определяющую комплементарность область антитела, как определено в Lefranc, MP et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области/CDR, определенных в данном документе.

[92] Иллюстративные обозначения CDR показаны в данном документе, однако специалисту в данной области техники будет понятно, что обычно используется ряд определений CDR, в том числе определение согласно Kabat (см. "Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010;47:694-700), которое основано на варибельности последовательностей и является наиболее широко применяемым. Определение согласно Chothia основано на положении областей структурных петель (Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989; 342:877-883). Альтернативные определения CDR, представляющие интерес, включают без ограничения определения, раскрытые в Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes." *J Immunol.* 2008;181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004;17:132-143 и Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995;9:133-139., каждый из которых конкретно включена в данный документ посредством ссылки.

[93] Термины "антитело, содержащее только тяжелые цепи" и "антитело на основе тяжелых цепей" применяются в данном документе взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к антителам или к одному или нескольким частям антитела, например, одному или нескольким плечам антитела, отсутствию легкой цепи традиционного антитела. Термины конкретно включают без ограничения гомодимерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен VH и константные домены CH2 и CH3 в отсутствие домена CH1; функциональные (антигенсвязывающие) варианты таких антител, растворимые варианты VH, Ig-NAR, содержащие гомодимер одного варибельного домена (V-NAR) и пяти C-подобных константных доменов (C-NAR) и их функциональные фрагменты, и растворимые однодоменные антитела (sUniDabs™). В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена варибельной области, состоящего из каркасной области 1, CDR1, каркасной области 2, CDR2, каркасной области 3, CDR3, и каркасной области 4. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов CH2 и CH3. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и

домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3. В данном документе также предусмотрены антитела, содержащие только тяжелые цепи, в которых домен СН2 и/или СН3 является усеченным. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но не содержит шарнирную область. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может находиться в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью или иным образом, ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но в данном документе также предусмотрены антитела, принадлежащие к другим подклассам, таким как подклассы IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности, к подтипу IgG1 или IgG4. В одном варианте осуществления антитело, содержащее тяжелые цепи, относится к подтипу IgG4, где один или несколько доменов СН модифицированы с изменением эффекторной функции антитела. В одном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей, относится к подтипу IgG1 или IgG4, где один или несколько доменов СН модифицированы с изменением эффекторной функции антитела. В данном документе дополнительно описаны модификации доменов СН, которые обеспечивают изменение эффекторной функции. Неограничивающие примеры антител, содержащих тяжелые цепи, описаны, например, в WO 2018/039180, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[94] В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, применяют в качестве связывающего (нацеливающего) домена химерного антигенного рецептора (CAR). Определение конкретно включает человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые крысами, трансгенными по иммуноглобулину человека (UniRat<sup>TM</sup>), называемые UniAbs<sup>TM</sup>. Вариабельные области (VH) UniAbs<sup>TM</sup> называются UniDabs<sup>TM</sup>, и представляют собой универсальные строительные блоки, которые можно связать с Fc-областями или сывороточным альбумином для разработки новых терапевтических средств с мультиспецифичностью, повышенной эффективностью и продленным периодом полувыведения. Поскольку в гомодимерных UniAb<sup>TM</sup> отсутствует легкая цепь и, следовательно, домен VL, антиген распознается одним единственным доменом, т. е. вариабельным доменом тяжелой цепи антитела, содержащего тяжелые цепи (VH или VHH).

[95] "Интактная цепь антитела", применяемая в данном документе, представляет собой цепь, содержащую полноразмерную вариабельную область и полноразмерную константную область (Fc). Интактное "традиционное" антитело содержит интактную легкую цепь и интактную тяжелую цепь, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи: СН1, шарнир, СН2 и СН3 для секретируемого IgG. Другие изотипы, такие как IgM или IgA, могут содержать другие домены СН.

Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или варианты их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может характеризоваться одной или несколькими "эффекторными функциями", которые относятся к тем биологическим активностям, которые приписываются константной Fc-области (Fc-области нативной последовательности или Fc-области варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител предусматривают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности. Варианты константной области предусматривают те, которые обеспечивают изменение эффекторного профиля, связывания с Fc-рецепторами и т. п.

[96] В зависимости от аминокислотной последовательности Fc (константного домена) их тяжелые цепи антитела и различные антигенсвязывающие белки могут быть представлены в виде разных классов. Существует пять основных классов Fc-областей тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные Fc-домены, которые соответствуют разным классам антител, могут обозначаться как  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов являются хорошо известными. Формы Ig предусматривают шарнирные модификации или бесшарнирные формы (Roux et al. (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Легкие цепи антител любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух типов, называемых  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитела в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут содержать последовательности легкой каппа-цепи или последовательности легкой лямбда-цепи.

[97] "Функциональная Fc-область" обладает "эффекторной функцией" Fc-области нативной последовательности. Неограничивающие примеры эффекторных функций предусматривают связывание C1q; CDC; связывание Fc-рецептора; ADCC; ADCP; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и т. п. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область взаимодействовала с рецептором, например, рецепторами Fc $\gamma$ RI; Fc $\gamma$ RIIA; Fc $\gamma$ RIIB1; Fc $\gamma$ RIIB2; Fc $\gamma$ RIIA; Fc $\gamma$ RIIB и низкоаффинным рецептором FcRn; и могут быть оценены с применением различных анализов, известных из уровня техники. "Мертвая" или "подвергнутая сайленсингу" Fc-область представляет собой такую область, которая была мутирована с сохранением активности в отношении, например, продления периода полужизни в сыворотке крови, но которая не активирует высокоаффинный Fc-рецептор, или которая характеризуется уменьшенной аффинностью к Fc-рецептору.

[98] "Fc-область нативной последовательности" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, обнаруженной в природе. Человеческие Fc-области нативной последовательности предусматривают, например, Fc-область человеческого IgG1 нативной последовательности (отличные от A и аллотипы A); Fc-область человеческого IgG2 нативной последовательности; Fc-область человеческого IgG3 нативной последовательности и Fc-область человеческого IgG4 нативной последовательности, а также их встречающиеся в природе варианты.

[99] "Вариант Fc-области" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от такой последовательности в Fc-области нативной последовательности на по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, предпочтительно одну или несколько аминокислотных замен. Предпочтительно вариант Fc-области характеризуется по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с Fc-областью нативной последовательности или Fc-областью исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-области нативной последовательности или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области по данному документу будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью нативной последовательности и/или с Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними.

[100] Варианты последовательностей Fc могут предусматривать три аминокислотные замены в области CH<sub>2</sub> для уменьшения связывания FcγRI в положениях 234, 235 и 237 согласно EU-индекса (см. Duncan et al., (1988) Nature 332:563). Две аминокислотные замены в сайте связывания комплемента C1q в положениях 330 и 331 согласно EU-индекса обеспечивают уменьшение фиксации комплемента (см. Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993) и Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). Замена остатков человеческого IgG1 или IgG2 в положениях 233-236 и остатков IgG4 в положениях 327, 330 и 331 обеспечивает значительное уменьшение ADCC и CDC (см., например, Armor KL. et al., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; и Shields RL. et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Аминокислотная последовательность Fc человеческого IgG4 (UniProtKB № P01861) представлена в данном документе под SEQ ID NO: 92. Подвергнутый сайленсингу IgG1 описан, например, в Boesch, A.W., et al., "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions." MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[101] Возможны и другие варианты Fc, в том числе без ограничения вариантов, в котором подвергнута делеции область, способная образовывать дисульфидную связь, или в котором удалены определенные аминокислотные остатки на N-конце нативного Fc, или к нему добавлен остаток метионина. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления одна или несколько Fc-частей антитела могут характеризоваться одной или несколькими мутациями в шарнирной области с устранением дисульфидной связи. В еще одном варианте осуществления шарнирная область Fc может быть полностью удалена. В еще одном варианте осуществления антитело может содержать вариант Fc.

[102] Кроме того, можно сконструировать вариант Fc для удаления или значительного снижения эффекторных функций посредством замены (мутирования), делеции или добавления аминокислотных остатков для воздействия на связывание комплемента или связывание Fc-рецептора. Например, и без ограничения делеция может происходить в сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q. Методики получения таких производных последовательностей Fc-фрагмента иммуноглобулина раскрыты в международных публикациях заявки на патент №№ WO 97/34631 и WO 96/32478. Кроме того, Fc-домен может быть модифицирован посредством фосфорилирования, сульфатирования, ацилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и т. п.

[103] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариант человеческой последовательности домена CH3 IgG4, характеризующийся мутацией T366W, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью с выступом CH3 IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариант человеческой последовательности домена CH3 IgG4, характеризующийся мутацией T366S, мутацией L368A и мутацией Y407V, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью с впадиной CH3 IgG4. Мутации CH3 IgG4, описанные в данном документе, можно использовать любым подходящим способом, чтобы поместить "выступ" на первой константной области тяжелой цепи первого мономера в димере антитела и "впадину" на второй константной области тяжелой цепи второго мономера в димере антитела, за счет чего облегчается соответствующее спаривание (гетеродимеризация) требуемой пары полипептидных субъединиц тяжелой цепи в антителе.

[104] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариант Fc-области человеческого IgG4, содержащий мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариант Fc-области человеческого IgG4, содержащий мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина).

[105] Термин "антитело, содержащее Fc-область" относится к антителу, которое содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации согласно EU) Fc-области может быть удален, например, во время очистки антитела или посредством рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Соответственно, антитело, содержащее Fc-область в соответствии с настоящим изобретением, может содержать антитело с или без K447.

[106] Аспекты настоящего изобретения предусматривают антитела, содержащие переменную область, представленную только тяжелыми цепями, в моновалентной или бивалентной конфигурации. Применяемый в данном документе термин "моновалентная конфигурация", используемый в отношении домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями, означает, что присутствует только один домен переменной области, представленной только тяжелыми цепями, характеризующийся единственным сайтом связывания (см. фиг. 3, панель D, левое плечо антитела). В отличие от этого, термин "бивалентная конфигурация", применяемый в отношении домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями, означает, что присутствуют два домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями (каждый из которых характеризуется единственным сайтом связывания), и они соединены линкерной последовательностью (см. фиг. 5, панель D, левое плечо антитела). Неограничивающие примеры линкерных последовательностей обсуждаются далее в данном документе и включают без ограничения линкерные последовательности GS различной длины. Когда переменная область, представленная только тяжелыми цепями, находится в бивалентной конфигурации, каждый из двух доменов переменной области, представленной только тяжелыми цепями, может характеризоваться аффинностью связывания с одним и тем же антигеном или с разными антигенами (например, с разными эпитопами на одном и том же белке; двух разных белках и т. д.). Однако, если конкретно не указано иное, переменная область, содержащая только тяжелые цепи, обозначенная как находящаяся в "бивалентной конфигурации", подразумевается как содержащая два идентичных домена переменной области, содержащих только тяжелые цепи, соединенных линкерной последовательностью, где каждый из двух идентичных доменов переменной области, содержащей только тяжелые цепи, характеризуется аффинностью связывания с одним и тем же антигеном-мишенью.

[107] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, характеризующиеся мультиспецифическими конфигурациями, которые включают без ограничения биспецифические, триспецифические и т. д. Известно большое разнообразие способов и конфигураций белков, которые применяются в биспецифических моноклональных антителах (BsMAb), триспецифических антителах и т. д.

[108] Были разработаны различные способы получения мультивалентных искусственных антител посредством рекомбинантного слияния переменных доменов двух или более антител. В некоторых вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие домены в полипептиде соединены полипептидным линкером. Один неограничивающий пример такого полипептидного линкера представляет собой линкер GS, содержащий аминокислотную последовательность из четырех остатков глицина, за которыми следует один остаток серина, и где последовательность повторяется  $n$  раз, где  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до приблизительно 10, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 (SEQ ID NO: 110). Неограничивающие примеры таких линкеров предусматривают GGGGS (SEQ ID NO: 81) ( $n=1$ ) и GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82)

(n=2). Также могут быть применены другие подходящие линкеры, которые описаны, например, в Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 October 15; 65(10): 1357-69, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[109] Термин "трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" применяется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, содержащих три полипептидные субъединицы, состоящих по сути из них или состоящих из них, две из которых содержат одну тяжелую и одну легкую цепь моноклонального антитела или функциональные антигенсвязывающие фрагменты таких цепей антител, содержащие антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН, состоят по сути из них или состоят из них. Эта пара тяжелая цепь/легкая цепь характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном. Третья полипептидная субъединица содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержащее Fc-часть, содержащую домены СН2 и/или СН3, и/или СН4 в отсутствие домена СН1, и один или несколько антигенсвязывающих доменов (например, два антигенсвязывающих домена), который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, состоит по сути из них или состоит из них, где такой связывающий домен получен из вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела или характеризуется идентичностью последовательности с ней. Части такой вариабельной области могут кодироваться генными сегментами  $V_H$  и/или  $V_L$ , генными сегментами  $D$  и  $J_H$  или генными сегментами  $J_L$ . Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами  $V_HDJ_H$ ,  $V_LDJ_H$ ,  $V_HJ_L$  или  $V_LJ_L$ .

[110] В качестве соединения, связывающего ТСА, используется "антитело, содержащее только тяжелые цепи", или "антитело на основе тяжелых цепей", или "полипептид на основе тяжелых цепей", которые, как применяется в данном документе, означают одноцепочечное антитело, содержащее константные области тяжелой цепи СН2, и/или СН3, и/или СН4, но без домена СН1. В одном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов СН2 и СН3. В другом варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3. В данном документе также предусмотрены антитела на основе тяжелых цепей, в которых домен СН2 и/или СН3 является усеченным. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но не содержит шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью, дополнительно иным образом ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу, и может необязательно характеризоваться асимметричной поверхностью границы между одним или несколькими доменами СН для облегчения правильного спаривания между

полипептидными цепями. Антитело, содержащее тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но в данном документе также предусмотрены антитела, принадлежащие к другим подклассам, таким как подклассы IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности, к подтипу IgG1 или подтипу IgG4. Неограничивающие примеры соединения, связывающего TCA, описаны, например, в WO 2017/223111 и WO 2018/052503, описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[111] Антитела, содержащие тяжелые цепи, составляют приблизительно четверть антител IgG, продуцируемых верблюдовыми, например, верблюдами и ламами (Hamers-Casterman C., et al. *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Данные антитела образованы двумя тяжелыми цепями, но не содержат легкие цепи. Как следствие, варибельная антигенсвязывающая часть обозначается доменом VHH, и она представляет собой наименьший встречающийся в природе интактный антигенсвязывающий сайт длиной всего около 120 аминокислот (Desmyter, A., et al. *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Антитела на основе тяжелых цепей с высокой специфичностью и аффинностью могут быть получены к различным антигенам посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), и часть VHH можно легко клонировать и экспрессировать в дрожжах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). Также было показано, что у акул имеется единственный VH-подобный домен в их антителах, называемый VNAR. (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

[112] Термин "FOLR1" (также называемый FRa или FR $\alpha$ ) в данном контексте относится к гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанному мембранному белку, который связывается с фолатом и восстановленными производными фолиевой кислоты и опосредует внутриклеточную доставку 5-метилтетрагидрофолата. Термин "FOLR1" включает любой белок FOLR1 человека и отличных от человека видов животных и, в частности, включает человеческий FOLR1, а также FOLR1 отличных от человека млекопитающих.

[113] Применяемый в данном документе термин "человеческий FOLR1" включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи человеческого FOLR1 (UniProt P15328; HGNC ID 3791), независимо от его источника или способа получения. Таким образом, "человеческий FOLR1" включает человеческий FOLR1, естественно экспрессируемый клетками, и FOLR1, экспрессируемый на клетках, трансфицированных с помощью человеческого гена FOLR1.

[114] Термины "антитело к FOLR1, содержащее только тяжелые цепи", "антитело к FOLR1 только с тяжелыми цепями", "антитело к FOLR1 с тяжелыми цепями" и "антитело



на основе тяжелых цепей к FOLR1" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, представленного только тяжелыми цепями, как определено выше, иммуноспецифически связываясь с FOLR1, в том числе человеческим FOLR1, как определено выше. Определение включает без ограничения человеческие антитела на основе тяжелых цепей, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, в том числе UniRats<sup>TM</sup>, продуцирующие человеческие антитела к FOLR1 UniAb<sup>TM</sup>, как определено выше в данном документе.

[115] "Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении последовательности референтного полипептида определяется в виде процентного значения аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности контрольного полипептида, после выравнивания последовательностей и введения гэпов при необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотной последовательности генерируют с применением компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2.

[116] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента своего естественного окружения. Загрязняющими компонентами природной среды антитела являются материалы, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим вариантам применения антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более чем 95% по весу антитела согласно методу Лоури и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности согласно SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением кумасси синего или красителя на основе серебра. Выделенное антитело предусматривает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать.

Однако, обычно выделенное антитело будет получено посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

[117] Антитела по настоящему изобретению предусматривают мультиспецифические антитела. Мультиспецифические антитела характеризуются более одной специфичностью связывания. Термин "мультиспецифический" конкретно включает "биспецифический" и "триспецифический", а также аффинности независимого специфического связывания более высокого порядка, такие как полиэпитопная специфичность более высокого порядка, а также четырехвалентные антитела и фрагменты антител. Термины "мультиспецифическое антитело", "мультиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "мультиспецифическое антитело на основе тяжелых цепей" и "мультиспецифическое UniAb<sup>TM</sup>" применяются в данном документе в наиболее широком смысле, и они охватывают все антитела с более чем одной специфичностью связывания. Мультиспецифические антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 по настоящему изобретению конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися эпитопами на белке FOLR1, таком как человеческий FOLR1 (т. е. бивалентные и бипаратопные). Мультиспецифические антитела к FOLR1 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке FOLR1, таком как человеческий FOLR1, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как человеческий CD3 (т. е. бивалентные и бипаратопные). Мультиспецифические антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися или частично перекрывающимися эпитопами на белке FOLR1, таком как человеческий белок FOLR1, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как человеческий белок CD3 (т. е. трехвалентные и бипаратопные).

[118] Антитела по настоящему изобретению предусматривают моноспецифические антитела, характеризующиеся одной специфичностью связывания. Моноспецифические антитела конкретно предусматривают антитела, предусматривающие единственную специфичность связывания, а также антитела, содержащие более одной связывающей единицы, характеризующейся одинаковой специфичностью связывания. Термины "моноспецифическое антитело", "моноспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "моноспецифическое антитело на основе тяжелых цепей" и "моноспецифическое UniAb<sup>TM</sup>" применяются в данном документе в наиболее широком смысле и охватывают все антитела с одной специфичностью связывания. Моноспецифические антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 по настоящему изобретению конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с одним эпитопом на белке FOLR1, таком как человеческий FOLR1 (моновалентные и моноспецифические). Моноспецифические антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, имеющие более одной

связывающей единицы (например, мультивалентные антитела), иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке FOLR1, таком как человеческий FOLR1. Например, моноспецифическое антитело в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может включать переменную область тяжелой цепи, содержащую два антигенсвязывающих домена, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с одним и тем же эпитопом на белке FOLR1 (т. е. бивалентное и моноспецифическое).

[119] "Эпитоп" представляет собой сайт на поверхности молекулы антигена, с которым связывается единственная молекула антитела. Обычно антиген имеет несколько или множество разных эпитопов и реагирует со многими различными антителами. Термин конкретно предусматривает линейные эпитопы и конформационные эпитопы.

[120] "Картирование эпитопов" представляет собой процесс идентификации сайтов связывания или эпитопов антител на их антигенах-мишенях. Эпитопы антител могут представлять собой линейные эпитопы или конформационные эпитопы. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образованы аминокислотами, которые являются прерывистыми в белковой последовательности, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

[121] "Полиэпитопная специфичность" обозначает способность специфически связываться с двумя или более разными эпитопами на одной или разных мишенях. Как отмечалось выше, настоящее изобретение конкретно включает антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 с видами полиэпитопной специфичности, т. е. антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, связывающиеся с одним или несколькими неперекрывающимися эпитопами на белке FOLR1, таком как человеческий FOLR1; и антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, связывающиеся с одним или несколькими эпитопами на белке FOLR1 и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3. Термин "неперекрывающийся(-щиеся) эпитоп(ы)" или "неконкурентный(-е) эпитоп(ы)" антигена определяется в данном документе как означающий(-е) эпитоп(ы), который(ые) распознается(ются) одним представителем пары антигенспецифических антител, но не другим представителем. Пары антител или антигенсвязывающие области, нацеливающиеся на один и тот же антиген на мультиспецифическом антителе, распознающие неперекрывающиеся эпитопы, не конкурируют за связывание с этим антигеном и способны связывать этот антиген одновременно.

[122] Антитело связывается "по сути с тем же эпитопом", что и референтное антитело, если два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко применяемыми и быстрыми способами определения того, связываются ли два эпитопа с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы во множестве разных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряют с применением

радиоактивных или ферментных меток.

[123] Применяемый в данном документе термин "валентный" относится к конкретному количеству сайтов связывания в молекуле антитела.

[124] "Моновалентное" антитело имеет один сайт связывания. Таким образом, моновалентное антитело также является моноспецифическим.

[125] "Мультивалентное" антитело имеет два или более сайтов связывания. Таким образом, термины "бивалентный", "трехвалентный" и "четыревалентный" относятся к наличию двух сайтов связывания, трех сайтов связывания и четырех сайтов связывания соответственно. Таким образом, биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением является по меньшей мере бивалентным и может быть трехвалентным, четырехвалентным или иным образом мультивалентным. Бивалентное антитело в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может иметь два сайта связывания с одним и тем же эпитопом (т. е. бивалентный, монопаратопный) или с двумя разными эпитопами (т. е. бивалентный, бипаратопный).

[126] Известно большое разнообразие способов и конфигураций белков, которые применяются для получения биспецифических моноклональных антител (BsMAB), триспецифических антител и т. п.

[127] Термин "трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" применяется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, содержащих три полипептидные субъединицы, состоящих по сути из них или состоящих из них, две из которых содержат одну тяжелую цепь и одну легкую цепь моноклонального антитела или функциональные антигенсвязывающие фрагменты таких цепей антител, содержащие антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН, состоят по сути из них или состоят из них. Эта пара тяжелая цепь/легкая цепь характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном. Третья полипептидная субъединица содержит, по сути состоит или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащую домены СН<sub>2</sub>, и/или СН<sub>3</sub>, и/или СН<sub>4</sub> в отсутствие домена СН<sub>1</sub>, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, где такой связывающий домен получен из вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела или характеризуется идентичностью последовательности с ней. Части такой вариабельной области могут кодироваться генными сегментами V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub>, генными сегментами D и J<sub>H</sub> или генными сегментами J<sub>L</sub>. Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>DJ<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>J<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>J<sub>L</sub>. Белок ТСА использует антитело, содержащее только тяжелые цепи, как определено выше.

[128] Термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" применяется в данном документе в наиболее широком смысле для обозначения сконструированного рецептора, который прививает требуемую специфичность связывания (например, антигенсвязывающую область моноклонального антитела или другого лиганда) к трансмембранным и внутриклеточным сигнальным доменам. Как правило, рецептор

применяется для привнесения специфичности моноклонального антитела на Т-клетку с целью создания химерных антигенных рецепторов (CAR). (J Natl Cancer Inst, 2015; 108(7):dvj439; и Jackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13:370-383). Т-клетки с CAR представляют собой Т-клетки, которые были генетически сконструированы для продуцирования искусственного Т-клеточного рецептора для применения в иммунотерапии. В одном варианте осуществления "CAR-Т-клетка" означает Т-клетку для терапевтического применения, экспрессирующую трансген, кодирующий один или несколько химерных антигенных рецепторов, состоящих как минимум из внеклеточного домена, трансмембранного домена и по меньшей мере одного цитозольного домена.

[129] Термин "человеческое антитело" применяется в данном документе для обозначения антител, содержащих переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулина линии зародышевого типа. Человеческие антитела в данном документе могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулина линии зародышевого типа, например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*. Термин "человеческое антитело" конкретно включает антитела, представленные только тяжелыми цепями, содержащие последовательности переменных областей тяжелых цепей человека, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или мыши, в частности, UniAbs<sup>TM</sup>, продуцируемые с помощью UniRat<sup>TM</sup>, как определено в данном документе выше.

[130] Под "химерным антителом" или "химерным иммуноглобулином" подразумевают молекулу иммуноглобулина, содержащую аминокислотные последовательности из по меньшей мере двух разных локусов Ig, например, трансгенное антитело, содержащее часть, кодируемую локусом человеческого Ig, и часть, кодируемую локусом крысиного Ig. Химерные антитела предусматривают трансгенные антитела с отличными от человеческих Fc-областями или искусственными Fc-областями и человеческие идиотипы. Такие иммуноглобулины могут быть выделены из животных по настоящему изобретению, которые были сконструированы таким образом, чтобы продуцировать такие химерные антитела.

[131] Применяемый в данном документе термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от фазы распознавания и фазы активации иммунного ответа. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, такая как естественная клетка-киллер, способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Например, моноциты и макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом цитолизе клеток-мишеней и презентировании антигенов другим компонентам иммунной системы или связывании с клетками, которые презентуют антигены. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка

может фагоцитировать антиген-мишень или клетку-мишень.

[132] "Человеческие эффекторныe клетки" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют рецепторы, такие как Т-клеточные рецепторы или FcR, и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, при этом NK-клетки являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из их естественного источника, например, из крови или PBMC, как описано в данном документе.

[133] Термин "иммунная клетка" используется в данном документе в наиболее широком смысле, включая без ограничения клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, в том числе цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфноядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы.

[134] "Эффекторные функции" антитела относятся к тем видам биологической активности, которые приписываются Fc-области (Fc-области нативной последовательности или варианта аминокислотной последовательности Fc-области) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т. п.

[135] "Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "ADCC" относятся к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках обобщена в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, может быть выполнен *in vitro* анализ ADCC, такой как описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или в качестве дополнения активность ADCC молекулы, представляющей интерес, может быть оценена *in vivo*, например, в модели животного, такой как, которая раскрыта в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[136] "Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации

комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[137] "Аффинность связывания" относится к силе итоговой суммы нековалентных взаимодействий между единственным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, применяемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность можно измерить обычными способами, известными из уровня техники. Низкоаффинные антитела обычно медленно связывают антиген и характеризуются тенденцией к легкой диссоциации, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и характеризуются тенденцией к поддержанию связанного состояния.

[138] Применяемый в данном документе " $K_d$ " или "значение  $K_d$ " относится к константе диссоциации, определенной посредством биослойной интерферометрии BioLayer с применением прибора Octet QK384 (Fortebio Inc., Менло-Парк, Калифорния) в кинетическом режиме. Например, сенсоры на основе антитела к мышинной Fc нагружают слитым антигеном на основе мышинной Fc и затем погружают в лунки, содержащие антитела, для измерения скоростей ассоциации ( $k_{on}$ ), зависящих от концентрации. Скорости диссоциации антител ( $k_{off}$ ) измеряют на последней стадии, когда сенсоры погружают в лунки, содержащие только буфер.  $K_d$  представляет собой отношение  $k_{off}/k_{on}$  (для получения дополнительной подробной информации см. Consercion, J, et al., *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(8), 791-800, 2009).

[139] Термины "лечение", "осуществление лечения" и т. п. применяются в данном документе для обозначения достижения требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. "Лечение", применяемое в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще у которого оно не диагностировано; (b) подавление заболевания, т. е. остановку его развития; или (c) облегчение заболевания, т. е. обеспечение регрессии заболевания. Терапевтическое средство можно вводить до, во время или после начала заболевания или повреждения. Особый интерес представляет лечение продолжающегося заболевания, когда лечение приводит к стабилизации или уменьшению нежелательных клинических симптомов у пациента. Такое лечение желательно проводить до полной потери функции у пораженных тканей. Рассматриваемое

средство терапии можно вводить во время симптоматической стадии заболевания и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

[140] "Терапевтически эффективное количество" означает количество активного средства, которое необходимо для обеспечения терапевтического эффекта у субъекта. Например, "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое приводит к индуцированию, облегчению или иному улучшению патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, ассоциированных с заболеванием, или которое улучшает устойчивость к нарушению.

[141] Термин "характеризующийся экспрессией FOLR1" в широком смысле относится к любому заболеванию или нарушению, при котором экспрессия FOLR1 ассоциирована или вовлечена в один или несколько патологических процессов, которые являются характерными для заболевания или нарушения. Такие заболевания включают без ограничения карциномы, такие как формы рака яичника и матки (например, серозная карцинома высокой степени злокачественности, эндометриодная карцинома, серозная карцинома низкой степени злокачественности, светлоклеточная карцинома, муцинозная карцинома и рак эндометрия), рак легкого, рак почки, колоректальный рак, рак молочной железы, а также рак головного мозга (например, глиома, глиобластома).

[142] Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения млекопитающего, подлежащего оценке в отношении лечения и/или подлежащего лечению. В одном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека. Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" охватывают без ограничения индивидуумов, у которых имеется рак, индивидуумов с аутоиммунными заболеваниями, с патогенными инфекциями и т. п. Субъекты могут представлять собой людей, но также могут предусматривать других млекопитающих, в частности, тех млекопитающих, которые могут быть применимы в качестве лабораторных моделей заболеваний человека, например, мыши, крысы и т. п.

[143] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который представлен в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будут вводить состав. Такой состав является стерильным. "Фармацевтически приемлемые" вспомогательные вещества (среды-носители, добавки) представляют собой вспомогательные вещества, которые целесообразно вводить субъекту-млекопитающему для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента.

[144] "Стерильный" состав является асептическим или не содержит или по сути не содержит каких-либо живых микроорганизмов и их спор. "Замороженный" состав представляет собой состав, находящийся при температуре ниже 0°C.

[145] "Стабильный" состав представляет собой состав, в котором содержащийся белок по сути сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно состав по сути



сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Срок хранения обычно выбирают исходя из предполагаемого срока годности состава. В данной области техники доступны различные аналитические методики для измерения стабильности белка, и они описаны, например, в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Стабильность можно оценивать качественно и/или количественно с помощью множества разных способов, включая оценку образования агрегатов (например, с применением эксклюзионной хроматографии, посредством измерения мутности и/или посредством визуального осмотра); посредством оценки неоднородности заряда с применением катионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования под визуализационным контролем (iIEF) или капиллярного зонного электрофореза; анализа аминоконцевой или карбоксиконцевой последовательности; масс-спектрометрического анализа; анализа посредством SDS-PAGE для сравнения восстановленного и интактного антитела; пептидного картирования (например, триптического или LYS-C); оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела и т. п. Нестабильность может предусматривать любой из следующих факторов: агрегация, дезамидирование (например, дезамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризация (например, изомеризация Asp), отсечение/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимиды, неспаренный(-ые) цистеин(ы), удлинение N-конца, процессинг C-конца, различия в гликозилировании и т. п.

## II. Подробное описание

### Антитела к FOLR1

[146] В настоящем изобретении представлены семейства близкородственных антител, которые связываются с человеческим FOLR1. Антитела этих семейств содержат наборы последовательностей CDR, которые определены в данном документе и показаны в таблицах 1-3, и представлены последовательностями вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 23-74, изложенными в таблицах 5, 6, 8 и 9. Эти семейства антител обеспечивают ряд преимуществ, которые способствуют их применению в качестве терапевтического(-их) средства(средств) с клинической точки зрения. Антитела предусматривают представителей с рядом значений аффинности связывания, что позволяет выбрать конкретную последовательность с требуемой аффинностью связывания.

[147] Таблица 1. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1

SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
GFNFRSFG (SEQ ID NO: 1)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGAAFNI

		(SEQ ID NO: 18)
GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSTYI (SEQ ID NO: 7)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
GFISSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSGSSDI (SEQ ID NO: 9)	ASVGLEFDY (SEQ ID NO: 21)
GFTFSSYT (SEQ ID NO: 5)	ISSSSSTI (SEQ ID NO: 10)	ATVGLDFDY (SEQ ID NO: 22)
	ISSSSSI (SEQ ID NO: 11)	
	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	
	ITSSSSTI (SEQ ID NO: 13)	
	ISRSSDTI (SEQ ID NO: 14)	
	ISGSSDTI (SEQ ID NO: 15)	
	ITSSSDTI (SEQ ID NO: 16)	
	IDSSSSII (SEQ ID NO: 17)	

[148] Таблица 2. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F14)

<b>SEQ_aa_CDR1</b>	<b>SEQ_aa_CDR2</b>	<b>SEQ_aa_CDR3</b>
GNFRSFG (SEQ ID NO: 1)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGAAFNI (SEQ ID NO: 18)
GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSTYI (SEQ ID NO: 7)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
GFISSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	
GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSGSSDI (SEQ ID NO: 9)	
GFTFSSYT (SEQ ID NO: 5)	ISSSSSTI (SEQ ID NO: 10)	
	ISSSSSI (SEQ ID NO: 11)	

[149] Таблица 3. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F18)

<b>SEQ_aa_CDR1</b>	<b>SEQ_aa_CDR2</b>	<b>SEQ_aa_CDR3</b>
GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSTI (SEQ ID NO: 10)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLEFDY (SEQ ID NO: 21)
	ITSSSSTI (SEQ ID NO: 13)	ATVGLDFDY

		(SEQ ID NO: 22)
	ISRSSDTI (SEQ ID NO: 14)	
	ISGSSDTI (SEQ ID NO: 15)	
	ITSSSDTI (SEQ ID NO: 16)	
	IDSSSSII (SEQ ID NO: 17)	

[150] Таблица 4. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F14)

<b>ID клона №</b>	<b>SEQ_aa_CDR1</b>	<b>SEQ_aa_CDR2</b>	<b>SEQ_aa_CDR3</b>
352368	GFNFRSFG (SEQ ID NO: 1)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGAAFNI (SEQ ID NO: 18)
352317	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
352477	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358454	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358433	GFIFSSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358420	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358397	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358474	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358457	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358462	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358456	GFIFSSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358466	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358418	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)

358441	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358416	GFTFSSYT (SEQ ID NO: 5)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358480	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSTYI (SEQ ID NO: 7)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358396	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358413	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358468	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358452	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSGSSDI (SEQ ID NO: 9)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358464	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSTI (SEQ ID NO: 10)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358399	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358478	GFIFSSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358446	GFIFSSYS (SEQ ID NO: 3)	ISSGSSYI (SEQ ID NO: 6)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358442	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 8)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)
358393	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSSSI (SEQ ID NO: 11)	ARDVTSGIAAAGSAFNI (SEQ ID NO: 19)

[151] Таблица 5. Аминокислотные последовательности переменного домена антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F14).

<b>ID клона №</b>	<b>SEQ_aa_FR1_FR4</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
352368	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFNFRSFGMTWLR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGAAFNIRG QGTLVTVSS	23

352317	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	24
352477	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN ARN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	25
358454	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	26
358433	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	27
358420	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN ANN SLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	28
358397	EVQLVESGGGLVKPRGSLRLSCEASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	29
358474	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	30
358457	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	31

358462	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	32
358456	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	33
358466	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	34
358418	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	35
358441	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRGEDITAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	36
358416	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	37
358480	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSTYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	38
358396	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	39

358413	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	40
358468	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	41
358452	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVASISSGSSDIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	42
358464	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	43
358399	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	44
358478	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	45
358446	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDD AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	46
358442	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	47

358393	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWAR QAPGKGLEWVSYISSSSSIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	48
361027	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSS	26
380323	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIY YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCA R DVTSGIAAAGSAFNIRQGTLVTVSS	49

[152] Таблица 6. Консенсусные полные последовательностиorf семейства F14:

<b>ID клона №</b>	<b>Полная последовательность ORF</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
361027	MTEWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTI SRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIR GQGTLVTVSSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	50
380323	MTEWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTIS RDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTI SRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIR	51



	<p>GQGTLVTVSSESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN  STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  QPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLGLGK</p>	
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[153] Таблица 7. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F18)

<b>ID клона №</b>	<b>SEQ_aa_CDR1</b>	<b>SEQ_aa_CDR2</b>	<b>SEQ_aa_CDR3</b>
352391	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
352491	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
352496	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
352372	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLEFDY (SEQ ID NO: 21)
352564	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ITSSSSTI (SEQ ID NO: 13)	ASVGLEFDY (SEQ ID NO: 21)
352365	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSSTI (SEQ ID NO: 10)	ATVGLDFDY (SEQ ID NO: 22)
352672	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISRSSDTI (SEQ ID NO: 14)	ATVGLDFDY (SEQ ID NO: 22)
358614	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISRSSDTI (SEQ ID NO: 14)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358608	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISGSSDTI (SEQ ID NO: 15)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358598	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ITSSSDTI (SEQ ID NO: 16)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358589	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358596	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	IDSSSSII (SEQ ID NO: 17)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358655	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISGSSDTI (SEQ ID NO: 15)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)

358626	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358676	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358624	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358664	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358647	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISGSSDTI (SEQ ID NO: 15)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358656	GFSFSSYS (SEQ ID NO: 4)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)
358590	GFTFSSYS (SEQ ID NO: 2)	ISSSSDTI (SEQ ID NO: 12)	ASVGLDFDY (SEQ ID NO: 20)

[154] Таблица 8. Аминокислотные последовательности переменного домена антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 (семейство F18).

<b>ID клона №</b>	<b>SEQ_aa_FR1_FR4</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
352391	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	52
352491	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSDTIEYAGSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	53
352496	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	54
352372	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	55
352564	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYITSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	56

352365	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCATVGLDFDYRGQGTLVTVSS	57
352672	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISRSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCATVGLDFDYRGQGTLVTVSS	58
358614	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISRSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	59
358608	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWISYISGSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	60
358598	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	61
358589	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYL-MNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	62
358596	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYIDSSSSIIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	63
358655	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMKWVR QAPGKGLEWISYISGSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	64
358626	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDDDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	65
358676	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	66
358624	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLEWVSYISSSSSTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDDDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	67

358664	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMKWVR QAPGKGLDWVSYISSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	68
358647	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWISYISGSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	69
358656	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYISSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	70
358590	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYISSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	71
361029	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS	61
380327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVK GRFTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDF DYRGQGTLVTVSS	72

[155] Таблица 9. Консенсусные полные последовательностиorf семейства F18:

<b>ID клона №</b>	<b>Полная последовательность ORF</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
361029	MTEWSCIIIFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTIS RDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSS ESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEE MTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	73
380327	MTEWSCIIIFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	74

	GFSFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[156] Подходящее антитело может быть выбрано из антител, представленных в данном документе для разработки и терапевтического или другого применения, включая без ограничения применение в качестве биспецифического антитела, например, показанного на фиг. 3, панели D, или фиг. 5, панели D, или в качестве части структуры CAR-T. На фиг. 3, панели D, представлена иллюстрация мультиспецифического антитела к CD3 и к FOLR1, где домен антитела к FOLR1 является моновалентным и моноспецифическим. Домен антитела к CD3 содержит домен CH1 и пары с легкой цепью, в то время как домен антитела к FOLR1 происходит от антитела, содержащего только тяжелые цепи, и не содержит домен CH1 и не взаимодействует с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления две тяжелые цепи соединены в пару с использованием, например, технологии "выступы-во-впадины". На фиг. 5, панели D, представлена иллюстрация мультиспецифического антитела к CD3 и к FOLR1, где домен антитела к FOLR1 является бивалентным и моноспецифическим. Домен антитела к CD3 содержит домен CH1 и пары с легкой цепью, в то время как домен антитела к FOLR1 происходит от антитела, содержащего только тяжелые цепи, и не содержит домен CH1, и не взаимодействует с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления две тяжелые цепи соединены в пару с использованием, например, технологии "выступы-во-впадины".

[157] Антитело, изображенное на фиг. 3, панели D, представляет собой биспецифическое антитело к CD3 и к FOLR1, где связывающее плечо антитела к FOLR1 является моновалентным и моноспецифическим, а антигенсвязывающий домен плеча антитела к FOLR1 имеет моновалентную конфигурацию, означая, что присутствует только один антигенсвязывающий домен. Антитело, изображенное на фиг. 5, панель D, представляет собой биспецифическое антитело к CD3 и к FOLR1, где связывающее плечо антитела к FOLR1 является бивалентным и моноспецифическим, а антигенсвязывающий домен плеча антитела к FOLR1 имеет бивалентную конфигурацию, означая наличие двух идентичных антигенсвязывающих доменов, расположенных тандемно. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть бивалентным и бипаратопным, что означает наличие двух антигенсвязывающих доменов на плече антитела к FOLR1, и

каждый из таких антигенсвязывающих доменов содержит разную последовательность и связывается с разным эпитопом на белке FOLR1.

[158] Определение аффинности к кандидатному белку можно выполнять с применением способов, известных из уровня техники, таких как измерения с помощью *Viacore*. Представители семейства антител могут обладать аффинностью к FOLR1 с *K<sub>d</sub>*, составляющей от приблизительно  $10^{-6}$  до около приблизительно  $10^{-11}$ , включая без ограничения от приблизительно  $10^{-6}$  до около приблизительно  $10^{-10}$ ; от приблизительно  $10^{-6}$  до около приблизительно  $10^{-9}$ ; от приблизительно  $10^{-6}$  до около приблизительно  $10^{-8}$ ; от приблизительно  $10^{-8}$  до около приблизительно  $10^{-11}$ ; от приблизительно  $10^{-8}$  до около приблизительно  $10^{-10}$ ; от приблизительно  $10^{-8}$  до около приблизительно  $10^{-9}$ ; от приблизительно  $10^{-9}$  до около приблизительно  $10^{-11}$ ; от приблизительно  $10^{-9}$  до около приблизительно  $10^{-10}$ ; или любое значение в пределах этих диапазонов. Выбор аффинности может быть подтвержден посредством биологической оценки модуляции, например блокирования биологической активности FOLR1, включая анализы *in vitro*, доклинические модели и клинические испытания, а также оценку потенциальной токсичности.

[159] Представители семейства антител, представленные в данном документе, характеризуются перекрестной реактивностью с белком FOLR1 макака *Сynomolgus*, но могут быть сконструированы для устранения перекрестной реактивности с белком FOLR1 макака *Сynomolgus* или с FOLR1 любых других видов животных, при необходимости. Некоторые последовательности антител в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения характеризуются перекрестной реактивностью с мышинным белком FOLR1, но могут быть сконструированы для устранения перекрестной реактивности с мышинным белком FOLR1. Наоборот, некоторые последовательности антител в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения не характеризуются перекрестной реактивностью с мышинным FOLR1, но могут быть сконструированы для обеспечения перекрестной реактивности с мышинным FOLR1.

[160] Семейства FOLR1-специфичных антител в данном документе содержат домен VH, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH. Последовательности CDR могут быть расположены, например, в области аминокислотных остатков около 26-33; 51-58; и 97-116 для CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, предусмотренных в качестве примера последовательностей вариабельной области, представленной под SEQ ID NO: 23-74. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что последовательности CDR могут находиться в разных положениях, если выбрана другая последовательность каркасной области, хотя обычно порядок последовательностей остается одинаковым.

[161] Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антител к FOLR1 по настоящему изобретению могут быть охвачены следующими структурными формулами, где X обозначает вариабельную аминокислоту, которая может быть конкретной аминокислотой, как указано ниже:

## CDR1

G F X1 F X2 S X3 X4 (SEQ ID NO: 75),

где: X1 представляет собой N, T, I или S;

X2 представляет собой R или S;

X3 представляет собой F или Y; и

X4 представляет собой G, S или T; и

## CDR2

I S S X1 S X2 X3 I (SEQ ID NO: 76),

где: X1 представляет собой G или S;

X2 представляет собой S или T; и

X3 представляет собой Y, D, T или S; и

## CDR3

A R D V T S G I A A A G X1 A F N I (SEQ ID NO: 77),

где: X1 представляет собой A или S.

[162] Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антител к FOLR1 по настоящему изобретению могут быть охвачены следующими структурными формулами, где X обозначает переменную аминокислоту, которая может быть конкретной аминокислотой, как указано ниже:

## CDR1

G F X1 F S S Y S (SEQ ID NO: 78),

где: X1 представляет собой S или T; и

## CDR2

I X1 X2 S S X3 X4 I (SEQ ID NO: 79),

где: X1 представляет собой S, T или D;

X2 представляет собой S, R или G;

X3 представляет собой D или S; и

X4 представляет собой T или I; и

## CDR3

A X1 V G L X2 F D Y (SEQ ID NO: 80),

где: X1 представляет собой S или T; и

X2 представляет собой D или E.

[163] Репрезентативные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 показаны в таблицах 1, 2, 3, 4 и 7.

[164] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1 под любым из SEQ ID NO: 1-5. В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1 под любым из SEQ ID NO: 2 или 4. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4.

[165] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит

последовательность CDR2 под любым из SEQ ID NO: 6-17. В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR2 под любым из SEQ ID NO: 6-11. В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR2 под любым из SEQ ID NO: 10 и 12-17. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16.

[166] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR3 под любым из SEQ ID NO: 18-22. В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR3 под любым из SEQ ID NO: 18-19. В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR3 под любым из SEQ ID NO: 20-22. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19. В конкретном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20.

[167] В дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 2; последовательность CDR2, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 6; и последовательность CDR3, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 19.

[168] В дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность CDR1, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR2, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 16; и последовательность CDR3, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 20.

[169] В дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 23-49 (таблица 5).

[170] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 26. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 49.

[171] В дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 52-72 (таблица 8).

[172] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 61. В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 72.

[173] В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в антителе к FOLR1 по настоящему изобретению содержит одну или две аминокислотные замены относительно последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 или набора



последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 в любой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-22 (таблица 1).

[174] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 предпочтительно содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), в котором последовательность CDR3 характеризуется более чем или равной 80%, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности на уровне аминокислот с последовательностью CDR3 любого из антител, чьи последовательности CDR3 представлены в таблицах 1, 2, 3, 4 или 7, и связывается с FOLR1.

[175] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 предпочтительно содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), в котором полный набор CDR 1, 2 и 3 (в совокупности) имеет последовательность с более чем восьмидесятью пяти процентной (85%) идентичностью или равной ей на уровне аминокислот CDR 1, 2 и 3 (в совокупности) антител, последовательности CDR которых представлены в таблицах 1, 2, 3, 4 или 7, и связывается с FOLR1.

[176] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью, по меньшей мере 85% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с любой из последовательностей переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 23-49 (показанными в таблице 5), и связывается с FOLR1.

[177] В некоторых вариантах осуществления антитело к FOLR1 содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью, по меньшей мере 85% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с любой из последовательностей переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 52-72 (показанными в таблице 8), и связывается с FOLR1.

[178] В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или мультиспецифические антитела, которые могут характеризоваться любой из обсуждаемых в данном документе конфигураций, включая без ограничения молекулу, подобную биспецифическому трехцепочечному антителу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с FOLR1, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с белком, отличным от FOLR1. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, где каждый из антигенсвязывающих доменов

характеризуется специфичностью связывания в отношении FOLR1. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая характеризуется специфичностью связывания в отношении первого антигена (например, CD3), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержит Fc-часть, содержащую домены CH2, и/или CH3, и/или CH4, в отсутствие домена CH1. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая характеризуется специфичностью связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белка CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, который характеризуется специфичностью связывания в отношении FOLR1.

[179] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело содержит CD3-связывающий домен VH, который образует пару с переменным доменом легкой цепи. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой фиксированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL. CD3-связывающий домен VH и переменный домен легкой цепи вместе характеризуются аффинностью связывания в отношении CD3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность переменной области легкой цепи под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 90.

[180] Мультиспецифические антитела, содержащие описанный выше CD3-связывающий домен VH и переменный домен легкой цепи, обладают преимущественными свойствами, например, описанными в опубликованной заявке

согласно РСТ под номером WO2018/052503, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Любые мультиспецифические антитела и антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе, характеризующиеся аффинностью связывания в отношении FOLR1, могут быть объединены в комбинацию с любым из CD3-связывающих доменов и доменов фиксированной легкой цепи, описанных в данном документе (см., например, таблицу 10 и таблицу 11) и в опубликованной заявке согласно РСТ под номером WO2018/052503, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, а также с дополнительными последовательностями, такими как представленные в таблице 12 и таблице 13, с получением мультиспецифических антител, характеризующихся аффинностью связывания к одному или нескольким эпитопам FOLR1, а также к CD3.

[181] Таблица 10. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела к CD3

	<b>SEQ_aa_CDR1</b>	<b>SEQ_aa_CDR2</b>	<b>SEQ_aa_CDR3</b>
Тяжелая цепь	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 83)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 84)	AKDSRGYGDYRLGGA Y (SEQ ID NO: 85)
Легкая цепь	QSVSSN (SEQ ID NO: 86)	GAS (SEQ ID NO: 87)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 88)

[182] Таблица 11. Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей антитела к CD3

VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYRLGGA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 89)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 90)

[183] Таблица 12. Последовательности Fc-областей человеческих IgG1 и IgG4

<p>Человеческий IgG1 (UniProt № P01857)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p>
<p>Человеческий IgG4 (UniProt № P01861)</p>	<p>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 92)</p>
<p>Человеческий IgG1 с сайленсинговыми мутациями (Fc- область)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 93)</p>
<p>Человеческий IgG4 с сайленсинговыми мутациями (Fc- область)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHE ALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)</p>

[184] Таблица 13. Дополнительные последовательности.

Последовательность константной области легкой цепи антитела к CD3 (легкая каппа-цепь)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
Последовательность тяжелой цепи антитела к CD3 (VH+Fc IgG1 дикого типа)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLR AEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 96)
Последовательность тяжелой цепи антитела к CD3 (с подвергнутой сайленсингу Fc IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLR AEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 97)

<p>Последовательность константной области тяжелой цепи антитела к CD3 (с Fc IgG4 дикого типа)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSG SIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 98)</p>
<p>Последовательность константной области тяжелой цепи антитела к CD3 (с подвергнутой сайленсингу Fc IgG4)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSG SIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 99)</p>
<p>Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))</p>	<p>ESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFL<u>Y</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 100)</p>
<p>Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))</p>	<p>ESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSL<u>W</u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 101)</p>

<p>Полноразмерная легкая цепь антитела к CD3 (VL+каппа CL)</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 102)</p>
<p>Полноразмерная тяжелая цепь антитела к CD3 (VH+подвергнутая сайленсингу Fc IgG4+выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDSRGGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>W</u>CLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 103)</p>
<p>Моновалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358454) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYFCARDVTSGLIAAAGSAFNIRGQGLVTVSSSESKY GPPCP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLY<u>S</u>RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 104)</p>

<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358454) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMN WVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRGQGTLV TVSSESKYGPPCPP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGFFL<u>VS</u>RSLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK (SEQ ID NO: 105)</p>
<p>Моновалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358598) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCPP<u>PC</u> PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGFFL<u>VS</u>RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLGLK (SEQ ID NO: 106)</p>
<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358598) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSSGGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCPP<u>PC</u> PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGFFL<u>VS</u>RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLGLK (SEQ ID NO: 107)</p>



<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358454+ID клона 358598) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRGQGTLLTVSSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMN WVRQAPGKGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLLTVSSESK YGPPCP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFL<u>VS</u>RLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 108)</p>
<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к FOLR1 (ID клона 358598+ID клона 358454) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSYITSSSDTIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCASVGLDFDYRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYFCARDVTSGIAAAGSAFNIRGQGTLLTVSSESKY GPPCP<u>PC</u>PAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFL<u>VS</u>RLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 109)</p>

[185] В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или мультиспецифические антитела, которые могут характеризоваться любой из обсуждаемых в данном документе конфигураций, включая без ограничения молекулу, подобную биспецифическому трехцепочечному антителу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с FOLR1, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с белком, отличным от FOLR1. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая характеризуется специфичностью связывания в отношении первого антигена, и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащую Fc-часть, содержащую домены CH2, и/или CH3, и/или CH4, в

отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелых цепь/легкая цепь, которая характеризуется специфичностью связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белка CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, который характеризуется специфичностью связывания в отношении FOLR1.

[186] В некоторых вариантах осуществления, если антитело по настоящему изобретению является биспецифическим антителом, одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфическим в отношении человеческого FOLR1, в то время как другое плечо может быть специфическим в отношении клеток-мишеней, опухолеассоциированных антигенов, нацеливающих антигенов, например интегринов и т. д., антигенов патогенов, белков контрольных точек иммунного ответа и т. п. Клетки-мишени, в частности, включают раковые клетки, включающие без ограничения клетки солидных опухолей, например карцином, таких как рак яичника и матки (например, серозная карцинома высокой степени злокачественности, эндометриодная карцинома, серозная карцинома низкой степени злокачественности, светлоклеточная карцинома, муцинозная карцинома и рак эндометрия), рак легкого, рак почки, колоректальный рак, рак молочной железы, а также рак головного мозга (например, глиома, глиобластома). В некоторых вариантах осуществления одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) специфично в отношении человеческого FOLR1, тогда как другое плечо специфично в отношении CD3.

[187] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи антитела к CD3, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 90, связанную с последовательностью под SEQ ID NO: 95, полипептид тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий последовательность под любым из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99 и 103, и полипептид тяжелой цепи антитела к FOLR1, содержащий последовательность под любым из SEQ ID NO: 23-48 или 52-71, в моновалентной или бивалентной конфигурации, связанную с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 100 или 101. Эти последовательности можно объединять в комбинации различными способами для получения биспецифического антитела требуемого подкласса IgG, например: IgG1, IgG4, подвергнутого сайленсингу IgG1, подвергнутого сайленсингу IgG4. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 102, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 103, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 104, 105, 106, 107, 108 или 109. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 102, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 103, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 104, 105, 106, 107, 108 или 109.

[188] Аспекты настоящего изобретения включают одну или несколько последовательностей антител, описанных в данном документе, которые представлены в формате CAR-T, для применения в качестве одного или нескольких связывающих доменов, которые обеспечивают антигенной специфичностью CAR-T-клетку. В определенных вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1, и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1, которая содержит любую из SEQ ID NO: 1-5, последовательность CDR2, содержащую любую из SEQ ID NO: 6-17, и последовательность CDR3, содержащую любую из SEQ ID NO: 18-22. В определенных вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1, и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1, и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 16, и последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 23-74. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 23-74. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетка содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с FOLR1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 72. Аспекты настоящего изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие CAR-T-клетку, описанную в данном документе, а также способы лечения, которые включают введение терапевтически эффективного количества CAR-T-клетки, описанной в данном документе.

[189] В объем настоящего изобретения входят различные форматы мультиспецифических антител, включая без ограничения одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и их кратные формы. Мультиспецифические антитела в данном документе, в частности, включают Т-клеточные мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, связывающиеся с FOLR1 и CD3 (антитела к FOLR1 и к CD3). Такие антитела

индуцируют эффективное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих FOLR1.

Получение антител к FOLR1

[190] Антитела по настоящему изобретению могут быть получены посредством способов, известных из уровня техники. В предпочтительном варианте осуществления антитела по данному документу продуцируются трансгенными животными, в том числе трансгенными мышами и крысами, предпочтительно крысами, у которых нокаутированы или блокированы гены эндогенного иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления антитела на основе тяжелых цепей по данному документу продуцируют в UniRat™. UniRat™ характеризуются подвергнутыми сайленсингу эндогенными генами иммуноглобулина и в них используется транслокус тяжелой цепи иммуноглобулина человека для экспрессии разнообразного, оптимизированного естественным путем спектра полностью человеческих HCAb. В то время как локусы эндогенных иммуноглобулинов у крыс можно нокаутировать или подвергать сайленсингу с применением различных технологий, в UniRat™ для инактивации эндогенного крысиного J-локуса тяжелой цепи, Сκ-локуса легкой цепи и Сλ-локуса легкой цепи применяли технологии с использованием (эндо)нуклеазы цинковых пальцев (ZNF). Конструкции ZNF для микроинъекций в ооциты могут продуцировать линии IgH и IgL, характеризующиеся нокаутом (KO). Подробнее см., например, Geurts et al., 2009, Science 325:433. Определение характеристик крыс с нокаутом тяжелой цепи Ig описано у Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Преимущества технологии с использованием ZNF заключаются в том, что негомологичное соединение концов для сайленсинга гена или локуса посредством делеций до нескольких т. о. также может обеспечить сайт-мишень для гомологичной интеграции (Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67). Человеческие антитела на основе тяжелых цепей, продуцируемые в UniRat™, называются UniAbs™ и могут связывать эпитопы, которые не могут быть атакованы обычными антителами. Их высокая специфичность, аффинность и небольшой размер делают их идеальными для моно- и мультиспецифических вариантов применения.

[191] В дополнение к UniAbs™, в данный документ конкретно включены антитела, содержащие только тяжелые цепи, без каркасной области и мутаций VHH верблюдовых и их функциональные области VH. Такие антитела, содержащие только тяжелые цепи, могут продуцироваться, например, в трансгенных крысах или мышах, которые содержат полностью человеческие локусы генов, предусматривающие только тяжелые цепи, как описано, например, в WO 2006/008548, однако другие трансгенные млекопитающие, такие как кролик, морская свинка, крыса, также могут быть использованы, при этом крысы и мыши являются предпочтительными. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, в том числе их функциональные фрагменты VHH или VH, также могут продуцироваться с помощью технологии рекомбинантной ДНК посредством экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в подходящем эукариотическом или прокариотическом хозяине, в том числе, например, клетках млекопитающих (например, клетках CHO), E. coli или

дрожжах.

[192] Домены антител, содержащие только тяжелые цепи, сочетают в себе преимущества антител и низкомолекулярных лекарственных средств: могут быть моно- или поливалентными; характеризуются низкой токсичностью; и рентабельны в изготовлении. Благодаря небольшому размеру эти домены легко вводятся, включая пероральное или местное введение, характеризуются высокой стабильностью, включая стабильность в желудочно-кишечном тракте, и их период полувыведения можно адаптировать к требуемому применению или показанию. Кроме того, домены VH и VHH HCAb могут быть изготовлены посредством рентабельного способа.

[193] В конкретном варианте осуществления антитела на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению, в том числе UniAbs<sup>TM</sup>, характеризуются нативным аминокислотным остатком в первом положении области FR4 (аминокислотное положение 101 в соответствии с системой нумерации согласно Kabat), замещенным другим аминокислотным остатком, который способен нарушить экспонированный на поверхности гидрофобный участок, содержащий нативный аминокислотный остаток в этом положении или ассоциированный с ним. Такие гидрофобные участки обычно скрыты на поверхности границы с константной областью легкой цепи антитела, однако проявляются на поверхности в HCAb и по меньшей мере частично служат для нежелательной агрегации и ассоциации легких цепей HCAb. Замещенный аминокислотный остаток предпочтительно заряжен и более предпочтительно заряжен положительно, такой как лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H), предпочтительно аргинин (R). В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, полученные от трансгенных животных, содержат мутацию замены Trp на Arg в положении 101. Полученные HCAb предпочтительно характеризуются высокой антигенсвязывающей аффинностью и растворимостью в физиологических условиях при отсутствии агрегации.

[194] В качестве части настоящего изобретения были идентифицированы человеческие антитела IgG на основе тяжелых цепей к FOLR1 с уникальными последовательностями от животных UniRat<sup>TM</sup> (UniAb<sup>TM</sup>), которые связываются с человеческим FOLR1 в анализах связывания белка и клеток на основе ELISA. Идентифицированные последовательности вариabельной области тяжелой цепи (VH) являются положительными в отношении связывания человеческого белка FOLR1 и/или в отношении связывания с FOLR1+ клетками, и все они являются отрицательными в отношении связывания с клетками, которые не экспрессируют FOLR1. См., например, таблицу 14.

[195] Антитела на основе тяжелых цепей, связывающиеся с неперекрывающимися эпитопами на белке FOLR1, например UniAb<sup>TM</sup>, можно идентифицировать посредством анализов конкурентного связывания, таких как иммуноферментные анализы (анализы ELISA) или анализы конкурентного связывания на основе проточной цитометрии. Например, можно применять конкуренцию между известными антителами,

связывающимися с антигеном-мишенью, и антителом, представляющим интерес. С применением этого подхода можно разделить набор антител на те, которые конкурируют с референтным антителом, и те, которые не конкурируют с ним. Неконкурирующие антитела идентифицируют как связывающиеся с отдельным эпитопом, который не перекрывается с эпитопом, связанным с референтным антителом. Часто одно антитело иммобилизуют, антиген связывают и второе меченое (например, биотинилированное) антитело исследуют в анализе ELISA в отношении способности связывать захваченный антиген. Это также может быть выполнено с применением платформ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в том числе ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 и Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) и сканера изображений MX96 SPR (Ibis Technologies B.V.), а также на платформах биослойной интерферометрии, таких как Octet Red384 и Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Для получения дополнительной подробной информации см. в примерах в данном документе.

[196] Как правило, антитело "конкурирует" с референтным антителом, если оно вызывает приблизительно 15-100% уменьшение связывания референтного антитела с антигеном-мишенью, что определяется стандартными методиками, такими как описанные выше анализы конкурентного связывания. В различных вариантах осуществления относительное подавление составляет по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше.

Фармацевтические композиции, варианты применения и способы лечения

[197] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Примерами фармацевтически приемлемых носителей, применяемых в данном документе, являются без ограничения адъюванты, твердые носители, вода, буферы или другие носители, применяемые в данной области техники для хранения терапевтических компонентов или их комбинации.

[198] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAb<sup>TM</sup>), которое связывается с FOLR1. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое (включая биспецифическое) антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAb<sup>TM</sup>) со специфичностью связывания в отношении двух или более неперекрывающихся эпитопов на белке FOLR1. В предпочтительном варианте

осуществления фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое (включая биспецифическое и TCA) антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAb™) со специфичностью связывания с FOLR1 и со специфичностью связывания с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью на T-клетке, например белком CD3 на T-клетке).

[199] Фармацевтические композиции антител, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, получают для хранения путем смешивания белков, характеризующихся требуемой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), например, в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (PEG).

[200] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по сути изотоническими и изготавливаются в соответствии с условиями надлежащей производственной практики (GMP). Фармацевтические композиции могут быть предусмотрены в виде стандартной лекарственной формы (т. е. дозировки для однократного введения). Состав зависит от выбранного пути введения. Антитела по данному документу можно вводить посредством внутривенной инъекции или инфузии или подкожно. Для инъекционного введения антитела по данному документу могут быть составлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, как обсуждается выше. В качестве альтернативы антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разбавления с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением.

[201] Составы на основе антител раскрыты, например, в патенте США № 9034324. Подобные составы можно применять в случае антител на основе тяжелых цепей, включая UniAbs<sup>TM</sup>, по настоящему изобретению. Составы на основе антител для подкожного применения введения, описаны, например, в US20160355591 и US20160166689.

Способы применения

[202] Антитела к FOLR1 и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний и состояний, характеризующихся экспрессией FOLR1, включая без ограничения состояния и заболевания, описанные далее в данном документе.

[203] FOLR1, также известный как FR $\alpha$  (UniProt P15328; HGNC ID 3791), представляет собой гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанный мембранный белок, который связывается с фолатом и восстановленными производными фолиевой кислоты и опосредует внутриклеточную доставку 5-метилтетрагидрофолата. FOLR1 содержит внеклеточный домен (ECD) из 210 аминокислот, который характеризуется высокой аффинностью к фолату при нейтральном pH. После интернализации кислый pH вызывает конформационные изменения FOLR1, которые снижают аффинность FOLR1 к фолату, опосредуя высвобождение фолата с последующим возвратом FOLR1 на клеточную поверхность. Wibowo AS et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Sep 17;110(38):15180-8. FOLR1 сверхэкспрессируется во многих типах солидных опухолей, включая опухоли яичника, молочной железы, легкого, почки, толстой кишки и головного мозга, однако экспрессия FOLR1 в нормальных здоровых тканях, таких как почка, легкое, сетчатка и головной мозг, ограничена апикальной поверхностью эпителия, что снижает их контакт в кровотоке со средствами, нацеливающимися на FOLR1, и делает FOLR1 перспективной терапевтической мишенью. Cheung A et al. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):52553-52574. FOLR1 также может быть применимым для визуализации и диагностики FOLR1-положительных опухолей, и, более того, сообщается, что растворимый FOLR1 повышен у пациентов с карциномами яичника. Kurosaki A et al. Int J Cancer. 2016 Apr 15;138(8):1994-2002. Описано несколько моноклональных антител, конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и конъюгатов на основе фолата, специфичных к FOLR1. Cheung A et al. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):52553-52574. Кроме того, для лечения рака яичника исследуются Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR), специфичными к FOLR1. Kershaw MH et al. Clin Cancer Res. 2006 Oct; 12:6106-15; Song DG et al. Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4617-27.

[204] В одном аспекте антитела к FOLR1 (например, UniAbs<sup>TM</sup>) и фармацевтические композиции по данному документу можно применять для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией FOLR1, включая без ограничения солидные опухоли, например, карциномы, такие как формы рака яичника и матки (например, серозная карцинома высокой степени злокачественности, эндометриодная карцинома, серозная карцинома низкой степени злокачественности, светлоклеточная карцинома, муцинозная карцинома и рак эндометрия), рак легкого, рак почки, колоректальный рак,



рак молочной железы, а также рак головного мозга (например, глиома, глиобластома).

[205] Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения заболевания варьируются в зависимости от многих разных факторов, в том числе способа введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента, того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, например, домашних животных, таких как собаки, кошки, лошади и т. д., лабораторных млекопитающих, таких как кролики, мыши, крысы и т. д., и т. п. Лечебные дозировки можно подбирать для оптимизации безопасности и эффективности.

[206] Уровни дозировки могут быть легко определены обычным квалифицированным клиницистом и могут быть модифицированы по мере необходимости, например, по мере необходимости для модифицирования ответа субъекта на средство терапии. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалами-носителями для получения единичной лекарственной формы, варьируется в зависимости от хозяина, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Стандартные лекарственные формы обычно содержат от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг активного ингредиента.

[207] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая дозировка средства может находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне, составляющем 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз каждые 3-6 месяцев. Терапевтические средства по настоящему изобретению обычно вводят многократно. Интервалы между однократными дозировками могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня терапевтического средства в крови пациента. В качестве альтернативы терапевтические средства по настоящему изобретению можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения полипептида у пациента.

[208] Обычно композиции получают в виде инъекций, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Фармацевтические композиции по данному документу являются подходящими для внутривенного или подкожного введения, непосредственно или после растворения твердых (например, лиофилизированных) композиций. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополимер, для усиления адьювантного эффекта, как обсуждается выше. Langer, Science 249: 1527, 1990 и Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119,

1997. Средства по настоящему изобретению можно вводить в форме препарата для депонирования или препарата для имплантации, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить замедленное или пульсирующее высвобождение активного ингредиента. Фармацевтические композиции обычно составляют стерильными, по сути изотоническими и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

[209] Токсичность антител и структур антител, описанных в данном документе, можно определить стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или с помощью экспериментальных животных, например, посредством определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) или LD100 (дозы, летальной для 100% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектом представляет собой терапевтический индекс. Данные, полученные в результате этих анализов культур клеток и исследований с применением животных, можно применять для определения диапазона дозировок, который является нетоксичным для применения у людей. Дозировка антител, описанных в данном документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который предусматривает эффективную дозу с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны лечащим врачом, принимая во внимание состояние пациента.

[210] Композиции для введения обычно будут содержать антитело или другое аблятивное средство, растворенное в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе. Можно применять различные водные носители, например, забуференный солевой раствор и т. п. Эти растворы являются стерильными и обычно не содержат нежелательных веществ. Эти композиции можно стерилизовать посредством обычных, хорошо известных методик стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как средства, регулирующие pH и буферные средства, средства, регулирующие токсичность, и т. п., например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т. п. Концентрация активного средства в этих составах может варьироваться в широких пределах и будет выбрана в первую очередь на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и т. п. в соответствии с выбранным конкретным способом введения и потребностями пациента (например, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) and Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

[211] Также в объем настоящего изобретения входят наборы, содержащие активные средства и содержащие их составы по настоящему изобретению, а также инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, например, химиотерапевтическое лекарственное средство

и т. п. Наборы обычно включают этикетку, указывающую на целевое применение содержимого набора. Термин "этикетка", используемый в данном документе, предусматривает любой письменный или записанный материал, поставляемый вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

[212] Настоящее изобретение в данном документе полностью описано, и специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть выполнены без отклонения от сути или объема изобретения.

### **ПРИМЕРЫ**

**Пример 1. Применение проточной цитометрии для анализа связывания с FOLR1-положительными и FOLR1-отрицательными клетками антител к FOLR1 UniAbs™**

[213] В таблице 14 обобщена активность целевого связывания антител на основе тяжелых цепей к FOLR1 (HCAb). В столбце 1 указан ID клона HCAb. В столбце 2 указано связывание с FOLR1-положительными клетками IGROV-1, измеренное как кратность относительно фонового сигнала MFI. В столбце 3 показано связывание с клетками CHO, стабильно экспрессирующими человеческий FOLR1, измеренное как кратность относительно фонового сигнала MFI. В столбце 4 показано связывание с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FOLR1 яванского макака, измеренное как кратность относительно фонового сигнала MFI. В столбце 5 показано связывание с клетками CHO, которые не экспрессируют белок FOLR1, измеренное как кратность относительно фонового сигнала MFI.

Таблица 14. Связывание с FOLR1-экспрессирующей линией клеток

<b>ID клона</b>	<b>Клетка IGROV-1</b>	<b>CHO_huFOLR1</b>	<b>CHO_cyFOLR1</b>	<b>CHO_OFFtgt</b>
352368	547.5	1232.5	179.2	3.1
352317	711.1	1219.8	464.9	1.0
352477	1961.1	1588.6	361.9	1.0
358454		1226.7	1519.9	1.0
358433		1984.2	2534.3	1.0
358420		1764.8	2257.3	1.2
358397		276.9	331.4	1.2
358474		2244.9	2347.9	1.1
358457		2082.6	2523.0	1.0
358462		2151.3	2582.6	1.0
358456		1869.6	2091.2	1.0
358466		1602.4	2089.9	1.0
358418		1502.1	2082.4	1.1
358441		1897.7	2295.5	1.1

358416		1871.5	1815.7	1.1
358480		2142.7	1195.3	1.1
358396		1730.3	360.4	1.1
358413		1810.6	496.9	1.1
358468		1670.0	313.9	1.1
358452		1842.4	1.7	1.0
358464		2103.1	6.4	1.0
358399		2014.4	330.3	1.0
358478		427.4	1.1	1.1
358446		1273.0	1.5	1.1
358442		1598.7	1.2	1.0
358393		402.3	1.2	1.1
352391	646.2	943.6	198.0	1.0
352491	1642.6	1484.3	158.6	0.9
352496	1739.7	1405.5	156.7	0.9
352372	505.6	1128.7	122.8	0.9
352564	1787.5	816.2	84.5	1.0
352365	593.6	906.4	97.4	1.0
352672	2304.4	1067.3	623.4	0.9
358614		886.5	735.3	1.1
358608		1277.7	534.8	1.1
358598		1891.1	1011.0	0.7
358589		1576.9	996.3	0.9
358596		1962.3	1336.0	0.9
358655		926.2	590.3	1.0
358626		1713.3	1062.5	0.8
358676		979.8	717.0	0.8
358624		1669.3	932.9	0.8
358664		1468.7	729.3	0.8
358647		920.3	3.0	1.1
358656		1406.4	21.7	0.8
358590		1568.7	21.8	0.9

**Пример 2. Связывание HCAb к FOLR1 с FOLR1-положительными линиями клеток**

[214] Клетки IGROV-1, клетки OVCAR-3, клетки CHO, стабильно экспрессирующие человеческие FOLR1, клетки CHO, стабильно экспрессирующие FOLR1 яванского макака, и клетки CHO, стабильно экспрессирующие мышинные FOLR1, инкубировали с возрастающими количествами указанных антител и анализировали характеристики связывания. Данные представлены на фиг. 1, панелях А-Е, в виде кратности MFI относительно фона.

### Пример 3. Связывание HCAb к FOLR1 с клеткой-мишенью

[215] В таблице 15 обобщены значения EC50 связывания клеток-мишеней для антител на основе тяжелых цепей к FOLR1 (HCAb). В столбце 1 указан ID клона HCAb. В столбце 2 указаны значения EC50 связывания клеток в нМ с клетками IGROV-1. В столбце 3 указаны значения EC50 связывания клеток в нМ с клетками OVCAR-3. В столбце 4 указаны значения EC50 связывания клеток в нМ с клетками CHO, стабильно экспрессирующими человеческий FOLR1. В столбце 5 указаны значения EC50 связывания клеток в нМ с клетками CHO, стабильно экспрессирующими FOLR1 яванского макака. В столбце 6 указаны значения EC50 связывания клеток в нМ с клетками CHO, стабильно экспрессирующими мышинный FOLR1.

Таблица 15. Данные о связывании клеток-мишеней для HCAb к FOLR1

ID клона	EC50 для клеток IGROV-1	EC50 для клеток OVCAR-3	EC50 для CHO_huFOL R1	EC50 для CHO_cyFOL R1	EC50 для CHO_msFOL R1
352368	4.1	3.1	3.8	4.3	Н/П
352317	3.9	3.3	5.1	5.0	Н/П
352477	5.0	2.4	4.2	4.2	Н/П
358454	3.3	1.5	4.2	3.4	3.2
358433	4.1	1.3	5.9	3.1	3.6
358474	4.0	1.2	4.0	4.3	2.6
358457	3.6	1.1	4.6	3.0	2.5
352391	2.8	2.8	5.5	2.7	Н/П
352491	5.0	3.3	4.3	2.1	Н/П
352496	3.8	1.1	3.5	4.3	Н/П
352372	3.6	4.9	4.6	3.4	Н/П
352564	3.7	32.6	5.4	5.7	Н/П
352365	4.6	Н/П	3.8	3.3	Н/П
352672	8.8	6.3	5.9	2.9	Н/П
358614	2.1	0.7	1.9	2.7	Н/П
358598	2.6	0.6	1.9	2.4	Н/П

358589	3.7	0.9	3.3	1.9	Н/П
--------	-----	-----	-----	-----	-----

**Пример 4. Связывание НСАб к FOLR1 с FOLR2- и IZUMO1R-положительными линиями клеток**

[216] Связывание НСАб к FOLR1 с клетками CHO, стабильно экспрессирующими человеческий FOLR2 (также известный как бета-рецептор фолата, FR $\beta$ ), и клетками CHO, стабильно экспрессирующими человеческий IZUMO1R (также известный как дельта-рецептор фолата, FOLR4, FR $\delta$ , JUNO), анализировали с использованием ряда разных клонов. Данные представлены на фиг. 2, панелях А-В, в виде кратности MFI относительно фона. На вставках показано связывание антител к FOLR2 и к IZUMO1R с положительным контролем соответственно темно-серым цветом по сравнению с соответствующим изотипическим контролем светло-серым цветом.

**Пример 5. Анализ связывания НСАб к FOLR1**

[217] В таблице 16 обобщены результаты эксперимента BLI (Octet) по связыванию НСАб к FOLR1 с FOLR3 (также известным как гамма-рецептор фолата, FR $\gamma$ ). В качестве положительного контроля ответа BLI было включено антитело к FOLR3.

Таблица 16. Данные связывания BLI (Octet)

ИД клона	Связывание FOLR3
358454	Связывание отсутствует
358474	Связывание отсутствует
358614	Связывание отсутствует
358598	Связывание отсутствует
Антитело к FOLR3	Связывание

**Пример 6. Анализ аффинности связывания и эпитоп-специфическая сортировка НСАб к FOLR1**

[218] В таблице 17 обобщена информация об аффинности связывания и группе эпитопов для антител на основе тяжелых цепей к FOLR1 (НСАб). В столбце 1 указан ID клона НСАб. В столбце 2 указана аффинность НСАб к рекомбинантному человеческому FOLR1, измеренная с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с применением Octet QK-384. В столбце 3 указана группа эпитопов НСАб, определенная в эксперименте по конкурентному связыванию BLI с применением Octet QK-384.

Таблица 17. Аффинность связывания и группа эпитопов

ИД клона	KD (M)	Группа эпитопов
352368	3.29E-08	1
352317	8.70E-09	1
352477	1.25E-08	1
358454	6.78E-09	1
358433	6.34E-09	1

ID клона	KD (M)	Группа эпитопов
358474	7.62E-09	1
358457	6.82E-09	1
352391	3.48E-08	2
352491	3.74E-08	2
352496	4.18E-08	2
352372	5.27E-08	2
352564	8.11E-08	2
352365	1.25E-07	2
352672	3.60E-08	2
358614	2.68E-08	2
358598	2.27E-08	2
358589	2.23E-08	2

**Пример 7. Опосредованный моновалентным биспецифическим антителом цитолиз человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток**

[219] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток SKOV-3 инкубировали с возрастающими количествами биспецифического антитела в присутствии человеческих покоящихся Т-клеток, что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток и высвобождению цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . Результаты представлены на фиг. 3, панелях А, В и С соответственно. Биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 3, панели D (ID клона: 361027). В качестве положительного контроля было включено биспецифическое антитело к FOLR1 и к CD3\_ОКТ3 с тем же VH антитела к FOLR1 в том же формате. Отрицательное контрольное антитело, включающее домен связывания VH, который не связывается с FOLR1, не проявляло специфического лизиса (данные не показаны). FOLR1-отрицательные клетки CHO не проявляли специфического лизиса (данные не показаны).

**Пример 8. Опосредованный моновалентным биспецифическим антителом цитолиз человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток**

[220] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток SKOV-3 инкубировали с возрастающими количествами биспецифического антитела в присутствии человеческих покоящихся Т-клеток, что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток и высвобождению цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . Результаты представлены на фиг. 4, панелях А, В и С соответственно. Биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 4, панели D (ID клона: 361029). В качестве положительного

контроля было включено биспецифическое антитело к FOLR1 и к CD3\_ОКТ3 с тем же VH антитела к FOLR1 в том же формате.

**Пример 9. Опосредованный бивалентным биспецифическим антителом цитолиз человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток**

[221] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток SKOV-3 инкубировали с возрастающими количествами бивалентного биспецифического антитела в присутствии человеческих покоящихся Т-клеток, что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток и высвобождению цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . Результаты показаны на фиг. 5, панелях А, В и С соответственно. Бивалентное биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 5, панели D (ID клона: 380323). В качестве положительного контроля было включено бивалентное биспецифическое антитело к FOLR1 и к CD3\_ОКТ3 с тем же VH антитела к FOLR1 в том же формате.

**Пример 10. Опосредованный бивалентным биспецифическим антителом цитолиз человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток**

[222] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток SKOV-3 инкубировали с возрастающими количествами бивалентного биспецифического антитела в присутствии человеческих покоящихся Т-клеток, что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток и высвобождению цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . Результаты показаны на фиг. 6, панелях А, В и С соответственно. Бивалентное биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 6, панели D (ID клона: 380327). В качестве положительного контроля было включено бивалентное биспецифическое антитело к FOLR1 и к CD3\_ОКТ3 с тем же VH антитела к FOLR1 в том же формате.

**Пример 11. Опосредованный бивалентным биспецифическим антителом цитолиз человеческих опухолевых клеток HT-29 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток**

[223] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток HT-29 с низким уровнем экспрессии FOLR1 инкубировали с возрастающими количествами бивалентного биспецифического антитела в присутствии человеческих покоящихся Т-клеток, что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток и высвобождению цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . Результаты показаны на фиг. 7, панелях А, В и С соответственно. Бивалентное биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 7, панели D (ID клона: 380327). В качестве положительного контроля было включено бивалентное биспецифическое антитело к FOLR1 и к CD3\_ОКТ3 с тем же VH антитела к FOLR1 в том же формате.

**Пример 12. Опосредованный бивалентным биспецифическим антителом**



### **цитотиз человеческих опухолевых клеток SKOV-3 посредством перенаправления покоящихся Т-клеток при различных соотношениях эффектора и мишени**

[224] FOLR1-положительную линию опухолевых клеток SKOV-3 инкубировали с возрастающими количествами бивалентного биспецифического антитела в присутствии различных соотношений покоящихся человеческих Т-клеток (эффектора) и опухолевых клеток (мишени), что приводило в результате к специфическому лизису опухолевых клеток. Результаты показаны на фиг. 8, панели А. Бивалентное биспецифическое антитело состояло из плеча связывания антитела к CD3, образующего пару с доменом связывания VH антитела к FOLR1, как показано на фиг. 8, панели В (ID клона: 380327).

### **Пример 13. Фармакокинетика моновалентных и бивалентных биспецифических антител у мышей**

[225] Фармакокинетика однократной дозы (1 мг/кг) моновалентных биспецифических антител (ID клонов: 361027 и 361029) и бивалентных биспецифических антител (ID клонов: 380327 и 380333) у самок мышей BALB/c. Данные показаны на фиг. 9 в виде концентраций в сыворотке крови в указанные временные точки.

Таблица 18. Время полужизни моновалентных и бивалентных биспецифических антител у мышей BALB/c

<b>ID клона</b>	<b>Молекула</b>	<b>t1/2 (сутки)</b>
361027	FOLR1_моновалентное-1 x CD3_F2B	2.00
361029	FOLR1_моновалентное-2 x CD3_F2B	8.44
380327	FOLR1_бивалентное-2 x CD3_F2B	7.19
380333	FOLR1_бивалентное-3 x CD3_F2B	4.44

### **Пример 14. Эффективность in vivo бивалентного биспецифического антитела в опухолевой модели IGROV-1**

[226] Противоопухолевую эффективность бивалентного биспецифического антитела оценивали в гуманизированной мышинной ксенотрансплататной модели. На фиг. 10, панели А, изображено схематическое описание мышинной модели. Самкам мышей NCG посредством подкожной инъекции имплантировали  $5 \times 10^6$  клеток IGROV-1 и посредством внутрибрюшинной инъекции  $10 \times 10^6$  активированных человеческих PBMC. Мышей обрабатывали каждые трое суток посредством внутривенных инъекций либо 200 мкг бивалентного биспецифического антитела, состоящего из плеча связывания антитела к CD3, соединенного с доменом связывания VH антитела к FOLR1 (ID клона: 380327), либо 100 мкг моновалентного биспецифического антитела к FOLR1 и к CD3\_OKT3 с VH антитела к FOLR1 (ID клона: 361027), включенного в качестве положительного контроля. Данные показаны на панели В в виде результатов измерения объема опухоли.

### **Пример 15. Экспрессия FOLR1 на нормальных и злокачественных клетках**

[227] FOLR1 (FR $\alpha$ ) экспрессируется в нормальных здоровых тканях, включая легкие и почки, и нацеливание на FOLR1 с помощью рекрутера Т-клеток (TCE) может привести в результате к мишень-специфической внеопухолевой токсичности. Количественно оценивали экспрессию FOLR1 на клеточной поверхности на различных линиях клеток яичников и других солидных опухолей, а также на нормальных первичных

клетках. Количество молекул FOLR1 на клеточной поверхности (плотность антигена) FOLR1-положительных линий опухолевых клеток количественно оценивали с помощью проточной цитометрии. Плотность антигена FOLR1 на линиях опухолевых клеток яичника OVCAR-3, SKOV-3 и IGROV-1 варьировала от  $44 \times 10^3$  до  $1871 \times 10^3$  (фиг. 11), повторяя диапазон, наблюдаемый в клинических образцах пациентов с рецидивом рака яичника. В отличие от этого, нормальные первичные альвеолярные и бронхиальные эпителиальные клетки легких экспрессируют  $0,1 \times 10^3$  и  $0,8 \times 10^3$  FOLR1/клетка соответственно, а эпителиальные клетки коры почек экспрессируют  $6,7 \times 10^3$  FOLR1/клетка (фиг. 11). Сообщалось также об экспрессии FOLR1 в клетках сосудистого сплетения и эпителия сетчатки (Smith SB, Kekuda R, Gu X, Chancy C, Conway SJ, Ganapathy V. Expression of folate receptor alpha in the mammalian retinol pigmented epithelium and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;**40**(5):840-8; Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR, Jr., et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res* 1992;**52**(12):3396-401). Однако в данном случае измеренные плотности антигена FOLR1 варьировали от  $0,7 \times 10^3$  до  $1,3 \times 10^3$  соответственно. Поскольку верхняя граница экспрессии в нормальных тканях, экспрессирующих FOLR1, как сообщается, находится в диапазоне  $7 \times 10^3$ , линия клеток колоректальной опухоли HT-29 с плотностью антигена FOLR1  $8 \times 10^3$  была выбрана в качестве линии клеток, представляющей порог экспрессии FOLR1, при котором или ниже которого не требуется TCE-зависимая цитотоксичность. Значения представлены на фиг. 11, как среднее и стандартная погрешность среднего (SEM) 2-5 независимых экспериментов.

**Пример 16. Аффинность в отношении клеточной поверхности и лизис опухолевых клеток**

[228] Полностью человеческое биспецифическое антитело, которое связывается с FOLR1 (FR $\alpha$ ) и CD3, обозначаемое как TNB-928B, оценивали в отношении его характеристик связывания с клеточной поверхностью и способности лизировать FOLR1+ опухолевые клетки. На фиг. 12, панели А, представлено схематическое изображение TNB-928B, сконструированного по технологии "выступы-во-впадины". На схематическом изображении показан формат антитела. На фиг. 12, панели В, показана в отношении клеточной поверхности TNB-928B к FOLR1 (FR $\alpha$ ), экспрессируемого на клетках IGROV-1 (по результатам определения посредством анализа Скэтчарда). На фиг. 12, панели С, показаны результаты анализа цитотоксичности при совместном культивировании с Т-клетками (соотношение Е:Т 10:1), демонстрирующие лизис опухолевых клеток IGROV-1 через 48 ч.

**Пример 17. Преимущественная активация и пролиферация эффекторных Т-клеток**

[229] TNB-928B оценивали в отношении его потенциала преимущественно активировать эффекторные Т-клетки и стимулировать их пролиферацию. На фиг. 13, панели А, показаны результаты активации CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток, измеренные с

помощью проточного цитометрического анализа маркера активации CD69 через 48 ч совместного культивирования с Т-клетками от здорового донора и опухолевыми клетками SKOV-3 в соотношении Е:Т 5:1. На фиг. 13, панели В, показаны результаты пролиферации CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток, измеренные с помощью проточной цитометрии Ki67 после 72 ч совместного культивирования с опухолевыми клетками IGROV-1 при соотношении Е:Т 5:1. На фиг. 13, панели С, показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которые дополнительно гейтировали по экспрессии CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> для оценки процентной доли Treg-клеток, индуцированных через 72 ч после обработки с помощью 8 или 16 нМ РС или TNB-928В соответственно. \*p<0,05; ns, не значимо.

**Пример 18. Селективный лизис опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии FOLR1**

[230] TNB-928В оценивали в отношении его потенциала индуцировать селективный лизис опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии FOLR1 (FR $\alpha$ ), сохраняя при этом клетки с низким уровнем экспрессии FOLR1. Выполняли анализ цитотоксичности при совместном культивировании с Т-клетками от здорового донора (соотношение Е:Т 10:1). Результаты показаны на фиг. 14. На панели А продемонстрирован клеточный лизис опухолевых клеток SKOV-3 (высокая экспрессия FOLR1) через 48 часов. На панели В продемонстрирован клеточный лизис клеток HT-29 (низкая экспрессия FOLR1) через 48 часов. Данные результаты демонстрируют, что TNB-928В индуцирует селективный лизис опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии FOLR1 (FR $\alpha$ ), сохраняя при этом клетки с низким уровнем экспрессии FOLR1.

**Пример 19. Лизис опухолевых клеток, сопровождающийся низким высвобождением цитокинов**

[231] TNB-928В оценивали в отношении его потенциала индуцировать лизис опухолевых клеток, не индуцируя высвобождения высоких уровней цитокинов. Выполняли анализ цитотоксичности при совместном культивировании с Т-клетками от трех здоровых доноров (соотношение Е:Т 5:1). Аликвоты супернатанта культуры клеток собирали из анализов цитотоксичности и анализировали на высвобождение цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$ . При концентрациях TNB-928В, которые опосредуют стойкий лизис IGROV-1 и SKOV-3, уровни IL-2 и IFN $\gamma$  были ниже, чем уровни, индуцированные РС, содержащим ОКТ3, независимо от донора (фиг. 15). Кроме того, TNB-928В не проявляло ни цитотоксичности, ни высвобождения IL-2 или IFN $\gamma$  при тестировании на FOLR1(FR $\alpha$ )-отрицательной линии клеток LNCaP (фиг. 15).

**Пример 20. Опосредование лизиса опухолевых клеток и активности Т-клеток в опухолях яичника, полученных от пациентов**

[232] TNB-928В оценивали в отношении его потенциала опосредовать лизис опухолевых клеток и активность Т-клеток в клетках опухолей яичника, полученных от пациентов. TNB-928В, РС или NC добавляли к свежедиссоциированной ткани карциномы яичника и инкубировали без добавления экзогенных РВМС в течение 48-72 ч. Результаты представлены на фиг. 16. На панели А продемонстрирована максимальная

цитотоксичность клеток, полученных из ткани карциномы яичника от 5 различных пациентов-респондеров, обработанных посредством 10 нМ РС, 100 нМ TNB-928В или 100 нМ NS. На панели В продемонстрировано, что у респондеров экспрессия FOLR1 (FR $\alpha$ ) выше, чем у пациентов с отсутствием ответа. На панели С показаны репрезентативные кривые зависимости цитотоксичности от дозы, измеренные по высвобождению LDH, на панели D показано высвобождение IFN $\gamma$ , а на панели E показано высвобождение IL-2, измеренное с помощью MSD. На панели F показаны CD69<sup>+</sup> Treg, измеренные с помощью проточной цитометрии после инкубации в течение 72 ч с соответствующими PBMC пациента при соотношении E:T 1:1. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; ns, не значимо.

### **Пример 21. Дозозависимая регрессия опухоли в мышинной ксенотрансплататной модели NCG**

[233] TNB-928В оценивали в отношении его потенциала индуцировать регрессию опухоли дозозависимым образом в мышинной ксенотрансплататной модели NCG. Подробности модели и результаты представлены на фиг. 17. Мышам NCG (n=3/группа) посредством подкожной инъекции вводили  $5 \times 10^6$  клеток IGROV-1, и посредством внутрибрюшинной инъекции вводили  $10 \times 10^6$  покоящихся hPBMC Начиная с дня 3 после имплантации (pi), TNB-928В вводили посредством внутривенной инъекции в соответствующих дозах (показаны стрелками вниз) каждые 3 суток, всего 9 доз. Схематическая диаграмма исследования представлена на панели А. Опухоли отбирали в день 30 и подвергали ИHC-окрашиванию антителами к человеческому CD3, человеческому CD45 и человеческому FR $\alpha$ . Положительно окрашенные клетки оценивали количественно, и результаты показаны на панели В. PK TNB-928В оценивали у мышей BALB/c после однократной инъекции в хвостовую вену в дозах 1 и 10 мг/кг. Клиренс (CL) TNB-928В варьировал от 7,9 до 10,3 мл/сутки/кг. Период полужизни ( $t_{1/2}$ ) варьировал от 3,9 до 8 суток для TNB-928В (фиг. 17, панель С). Поскольку ни одно из плеч TNB-928В не характеризуется перекрестной реактивностью с FOLR1 (FR $\alpha$ ) или CD3 у видов грызунов, наблюдаемая линейная фармакокинетика была ожидаемой и согласуется с неспецифическими механизмами клиренса. Эти результаты позволяют предположить, что TNB-928В является стабильным *in vivo* с благоприятной PK и периодом полужизни, подобным традиционным антителам.

### **Пример 22. Определение характеристик при термальном стрессе и характеристик стабильности**

[234] Оценивали биофизические характеристики TNB-928В, и результаты обобщены на фиг. 18 и фиг. 21. Все антитела составляли в 20 mM цитрате и 0,1 M NaCl, pH 6,2. Высокомолекулярные фрагменты (HMW) измеряли с помощью SEC-UPLC (ThermoFisher UltiMate<sup>TM</sup> 3000 HPLC) до ( $T_0$ ) и после воздействия термального стресса ( $T_{30}$ ) в течение 1 месяца при 37°C. Процентная доля низкомолекулярных (% LMW) и высокомолекулярных фрагментов (% HMW) показана при T=0 и T=30 суток на фиг. 18. Стабильность TNB-928В оценивали после инкубации при 4°C и 37°C в течение 1 месяца.

Хроматограммы SEC-UPLC показаны на фиг. 21.

### **Пример 23. Влияние валентности FOLR1**

[235] Для определения влияния валентности FOLR1 ( $FR\alpha$ ) на функциональную активность TCE FOLR1 x CD3 *in vitro* в анализах цитотоксичности клетки IGROV-1 (высокая плотность антигена  $FR\alpha$ ) совместно культивировали с первичными человеческими пан-Т-клетками вместе с TCE FOLR1 в течение 48 часов. Способность TNB-928B опосредовать лизис IGROV-1 сравнивали с соответствующим биспецифическим антителом, содержащим тот же самый VH, который является моновалентным для FOLR1. В присутствии опухолевых клеток IGROV-1 как TNB-928B, так и бивалентные антитела к PC проявляли эффект avidности, наблюдаемый при более низких значениях  $EC_{50}$  (повышенная активность) по сравнению с соответствующими моновалентными антителами (фиг. 19). Важно отметить, что TNB-928B демонстрировал аналогичный максимальный лизис опухолевых клеток по сравнению с PC при насыщающих дозах с ~75% лизисом IGROV-1. В совокупности из таких данных видно, что бивалентный формат TNB-928B проявляет сильный эффект avidности в отношении цитолиза опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии FOLR1, и TNB-928B достигает максимальной активности, сопоставимой с PC.

### **Пример 24. Клинические и молекулярные характеристики образцов опухоли яичника *ex vivo***

[236] Оценивали клинические и молекулярные характеристики свежих полученных от пациентов образцов *ex vivo* опухоли яичника, и результаты представлены на фиг. 20. В столбце под названием “Максимальный лизис TNB-928B в %” представлены данные для образца, обработанного 100 нМ TNB-928B в течение от 48 до 72 ч. Сокращения: HGSC: серозная карцинома высокой степени злокачественности; HGC: карцинома высокой степени злокачественности; LGESS: эндометриальная стромальная саркома низкой степени злокачественности; LGSC: серозная карцинома низкой степени злокачественности; nd: не определено.

### **Пример 25. Активность при низких соотношениях E:T и в присутствии sFOLR1**

[237] Подобно другим GPI-заякоренным белкам, FOLR1 отщепляется от клеточной поверхности. Уровень растворимого белка FOLR1 (sFOLR1; s $FR\alpha$ ) повышен в сыворотке крови пациентов с раком яичника, и как у пациентов с ранним, так и с раком яичника на поздней стадии высокий уровень sFOLR1 связан с более короткой PFS (Kurosaki A, Hasegawa K, Kato T, Abe K, Hanaoka T, Miyara A, et al. Serum folate receptor alpha as a biomarker for ovarian cancer: Implications for diagnosis, prognosis and predicting its local tumor expression. *Int J Cancer* 2016;**138**(8):1994-2002; Leung F, Dimitromanolakis A, Kobayashi H, Diamandis EP, Kulasingam V. Folate-receptor 1 (FOLR1) protein is elevated in the serum of ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2013;**46**(15):1462-8). Более того, экспрессия FOLR1 на опухолевых клетках сильно коррелирует с уровнями sFOLR1. Для определения влияния sFOLR1 на TNB-928B-опосредованный лизис опухолевых клеток

выполняли анализ цитотоксичности с Т-клетками и клетками SKOV-3 в присутствии экзогенно добавленного растворимого рекомбинантного FOLR1 в концентрации 10 нг/мл, 100 нг/мл и 1000 нг/мл. Минимальное снижение активности TNB-928В-опосредованного лизиса опухолевых клеток SKOV-3 было выявлено в присутствии sFOLR1 до 1000 нг/мл, что примерно в 100 раз выше, чем уровень sFOLR1, измеренный в сыворотке крови пациентов с ЕОС (Kurosaki A, Hasegawa K, Kato T, Abe K, Hanaoka T, Miyara A, et al. Serum folate receptor alpha as a biomarker for ovarian cancer: Implications for diagnosis, prognosis and predicting its local tumor expression. *Int J Cancer* 2016;**138**(8):1994-2002; O'Shannessy DJ, Somers EB, Palmer LM, Thiel RP, Oberoi P, Heath R, et al. Serum folate receptor alpha, mesothelin and megakaryocyte potentiating factor in ovarian cancer: association to disease stage and grade and comparison to CA125 and HE4. *J Ovarian Res* 2013;**6**(1):29), но максимальный лизис клеток оставался без изменений (фиг. 22, панель В). Для определения, стабилен ли экзогенный sFOLR1 в течение всего периода анализа цитотоксичности, уровни sFOLR1 в супернатанте культуры клеток репрезентативных лунок количественно оценивали с помощью ELISA через 48 часов. Измеренные уровни sFOLR1 через 48 часов были сопоставимы с количеством экзогенного sFOLR1 (фиг. 22, панель С). Такие данные свидетельствуют о том, что на цитотоксическую активность TNB-928В не влияют уровни sFOLR1, сравнимые с физиологическими уровнями, выявленными в сыворотке крови пациентов с раком яичника.

#### **Пример 26. Продуцирование цитотоксических гранул**

[238] Цитотоксичность, опосредованную TNB-928В, оценивали на полученных от пациентов образцах путем получения биоптатов свежей хирургически удаленной опухоли яичника. Образцы опухоли яичника *ex vivo* инкубировали с TNB-928В, РС или NC в течение периода от 48 до 72 часов. TNB-928В опосредовало значительный лизис опухолевых клеток *ex vivo*, сравнимый с РС в образцах диссоциированных опухолей яичника от пяти из восьми разных пациентов (фиг. 16 и 20). Важно отметить, что к данным образцам не добавляли экзогенные Т-клетки, что указывает на то, что эндогенных Т-клеток, присутствующих в опухоли, было достаточно для опосредования цитотоксичности опухолевых клеток. Плотность антигена FOLR1 была измерена на шести из восьми образцов от пациентов и была выявлена тенденция между образцами, демонстрирующими лизис опухоли <10% (не отвечающие) и >10% (респондеры) (фиг. 16, панель В). В двух не отвечающих на лечение плотность антигена FOLR1 была  $<1 \times 10^3$  (фиг. 20), и поэтому не ожидалось, что они проявят активность по результатам исследователей *in vitro*. В репрезентативном образце диссоциированной опухоли яичника EC50 для TNB-928В составляла 45,2 пМ, что согласуется с результатами *in vitro* (фиг. 16, панель С). Также согласуется с результатами по цитотоксичности *in vitro*, что TNB-928В индуцировало сниженные уровни высвобождения цитокинов, измеренные по IFN $\gamma$  и IL-2, по сравнению с РС (фиг. 16, панели D и E). Кроме того, опосредованный TNB-928В лизис опухолевых клеток сопровождался высвобождением цитотоксических гранул с уровнями перфорины и гранзима В в супернатанте, сравнимыми с РС (фиг. 23, панели A и B). Важно

отметить, что если образцы диссоциированных опухолей яичника инкубировали с соответствующими РВМС от пациентов при соотношении Е:Т 1:1, TNB-928В индуцировало в примерно 2,5 раза меньшую активацию Трег-клеток по сравнению с РС (фиг. 16, панель F). Такие данные свидетельствуют о том, что TNB-928В опосредует устойчивый цитолиз опухолевых клеток яичника в образцах первичной опухоли пациентов, которые экспрессируют высокие уровни FR $\alpha$ , отделяет цитотоксичность от высвобождения цитокинов и предпочтительно активирует эффекторные Т-клетки, а не Трег-клетки.

[239] Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от настоящего изобретения. Следует понимать, что при практической реализации настоящего изобретения можно использовать различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном документе. Предполагается, что последующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данных пунктов формулы изобретения и их эквивалентов.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее первую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1-5; и/или

(b) последовательность CDR2, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 6-17; и/или

(c) последовательность CDR3, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 18-22.

2. Антитело по п. 1, дополнительно содержащее вторую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1-5; и/или

(b) последовательность CDR2, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 6-17; и/или

(c) последовательность CDR3, имеющую две или меньше замен в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 18-22.

3. Антитело по любому из п. 1 или п. 2, где указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в человеческой каркасной области.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащее последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

5. Антитело по любому из пп. 1-4, где первая переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и/или

(b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и/или

(c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

6. Антитело по любому из пп. 2-5, где вторая переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и/или

(b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и/или

(c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

7. Антитело по любому из пп. 5-6, содержащее:

(a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и



(b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и

(c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

8. Антитело по любому из пп. 5-7, где вторая переменная область тяжелой цепи содержит:

(a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5; и

(b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17; и

(c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-22.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, содержащее:

(a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 или

(b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20.

10. Антитело по любому из пп. 1-9, содержащее последовательность переменной области тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 23-74.

11. Антитело по любому из пп. 1-10, содержащее последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-74.

12. Антитело по п. 11, где последовательность переменной области тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 72.

13. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее первую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 формулы:

G F X1 F X2 S X3 X4 (SEQ ID NO: 75),

где: X1 представляет собой N, T, I или S;

X2 представляет собой R или S;

X3 представляет собой F или Y; и

X4 представляет собой G, S или T; и

(b) последовательность CDR2 формулы:

I S S X1 S X2 X3 I (SEQ ID NO: 76),

где: X1 представляет собой G или S;

X2 представляет собой S или T; и

X3 представляет собой Y, D, T или S; и

(c) последовательность CDR3 формулы:

A R D V T S G I A A A G X1 A F N I (SEQ ID NO: 77),

где: X1 представляет собой A или S,

в моновалентном или бивалентном формате.

14. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее первую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 формулы:

G F X1 F S S Y S (SEQ ID NO: 78),

где: X1 представляет собой S или T; и

(b) последовательность CDR2 формулы:

I X1 X2 S S X3 X4 I (SEQ ID NO: 79),

где: X1 представляет собой S, T или D;

X2 представляет собой S, R или G;

X3 представляет собой D или S; и

X4 представляет собой T или I; и

(c) последовательность CDR3 формулы:

A X1 V G L X2 F D Y (SEQ ID NO: 80),

где: X1 представляет собой S или T; и

X2 представляет собой D или E,

в моновалентном или бивалентном формате.

15. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее: первую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 формулы:

G F X1 F X2 S X3 X4 (SEQ ID NO: 75),

где: X1 представляет собой N, T, I или S;

X2 представляет собой R или S;

X3 представляет собой F или Y; и

X4 представляет собой G, S или T; и

(b) последовательность CDR2 формулы:

I S S X1 S X2 X3 I (SEQ ID NO: 76),

где: X1 представляет собой G или S;

X2 представляет собой S или T; и

X3 представляет собой Y, D, T или S; и

(c) последовательность CDR3 формулы:

A R D V T S G I A A A G X1 A F N I (SEQ ID NO: 77),

где: X1 представляет собой A или S; и

вторую переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 формулы:

G F X1 F S S Y S (SEQ ID NO: 78),

где: X1 представляет собой S или T; и

(b) последовательность CDR2 формулы:

I X1 X2 S S X3 X4 I (SEQ ID NO: 79),

где: X1 представляет собой S, T или D;

X2 представляет собой S, R или G;

X3 представляет собой D или S; и

X4 представляет собой T или I; и

(с) последовательность CDR3 формулы:

A X1 V G L X2 F D Y (SEQ ID NO: 80),

где: X1 представляет собой S или T; и

X2 представляет собой D или E.

16. Антитело по п. 15, где первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к N-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи.

17. Антитело по п. 15, где первая переменная область тяжелой цепи расположена ближе к C-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи.

18. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR содержат последовательность, имеющую две или меньше замен в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

19. Антитело по п. 18, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

20. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее:  
переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH.

21. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее:  
переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

22. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее:  
переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

23. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее:  
переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

24. Антитело, которое связывается с FOLR1, содержащее:

первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH; и

вторую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

25. Антитело по п. 24, где первая вариабельная область тяжелой цепи расположена ближе к N-концу относительно второй вариабельной области тяжелой цепи.

26. Антитело по п. 24, где первая вариабельная область тяжелой цепи расположена ближе к C-концу относительно второй вариабельной области тяжелой цепи.

27. Антитело по любому из пп. 1-14 и пп. 18-23, которое является моноспецифическим.

28. Антитело по любому из пп. 1-26, которое является мультиспецифическим.

29. Антитело по п. 28, которое является биспецифическим.

30. Антитело по п. 28 или п. 29, которое характеризуется аффинностью связывания с белком CD3 и белком FOLR1.

31. Антитело по п. 28 или п. 29, которое характеризуется аффинностью связывания с двумя разными эпитопами на одном и том же белке FOLR1.

32. Антитело по п. 28 или п. 29, характеризующееся аффинностью связывания с эффекторной клеткой.

33. Антитело по п. 32, характеризующееся аффинностью связывания с T-клеточным антигеном.

34. Антитело по п. 33, характеризующееся аффинностью связывания с CD3.

35. Антитело по любому из пп. 1-34, которое представлено в формате CAR-T.

36. Биспецифическое антитело, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH.

37. Биспецифическое антитело, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью

связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

38. Биспецифическое антитело, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

39. Биспецифическое антитело, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, содержащий последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH, в моновалентной или бивалентной конфигурации.

40. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся аффинностью связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 83, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 84 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 85 в каркасной области человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 под

SEQ ID NO: 86, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 87 и последовательности CDR3 под SEQ ID NO: 88 в каркасной области человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1, где антигенсвязывающий домен содержит первую и вторую антигенсвязывающие области в бивалентной конфигурации, где:

первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 6 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 19 в каркасной области человеческой VH и

вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 4, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 16 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 20 в каркасной области человеческой VH.

41. Мультиспецифическое антитело по п. 40, где первая антигенсвязывающая область расположена ближе к N-концу относительно второй антигенсвязывающей области.

42. Мультиспецифическое антитело по п. 40, где первая антигенсвязывающая область расположена ближе к C-концу относительно второй антигенсвязывающей области.

43. Мультиспецифическое или биспецифическое антитело по любому из пп. 36-42, где первая и вторая антигенсвязывающие области антигенсвязывающего домена антитела на основе тяжелых цепей к FOLR1 соединены полипептидным линкером.

44. Мультиспецифическое или биспецифическое антитело по п. 43, где полипептидный линкер представляет собой линкер GS.

45. Мультиспецифическое или биспецифическое антитело по п. 44, где линкер GS состоит из последовательности под SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-45.

47. Способ лечения нарушения, характеризующегося экспрессией FOLR1, включающий введение субъекту с указанным нарушением антитела по любому из пп. 1-45 или фармацевтической композиции по п. 46.

48. Применение антитела по любому из пп. 1-45 в получении лекарственного препарата для лечения нарушения, характеризующегося экспрессией FOLR1.

49. Антитело по любому из пп. 1-45 для применения в лечении нарушения, характеризующегося экспрессией FOLR1.

50. Способ, применение или антитело по любому из пп. 47-49, где нарушение выбрано из группы, состоящей из рака яичника, форм рака матки, рака легкого, рака почки, колоректального рака, рака молочной железы и рака головного мозга.

51. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-45.

52. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 51.

53. Клетка, содержащая вектор по п. 52.

54. Способ получения антитела по любому из пп. 1-45, включающий выращивание клетки по п. 53 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела и выделение антитела

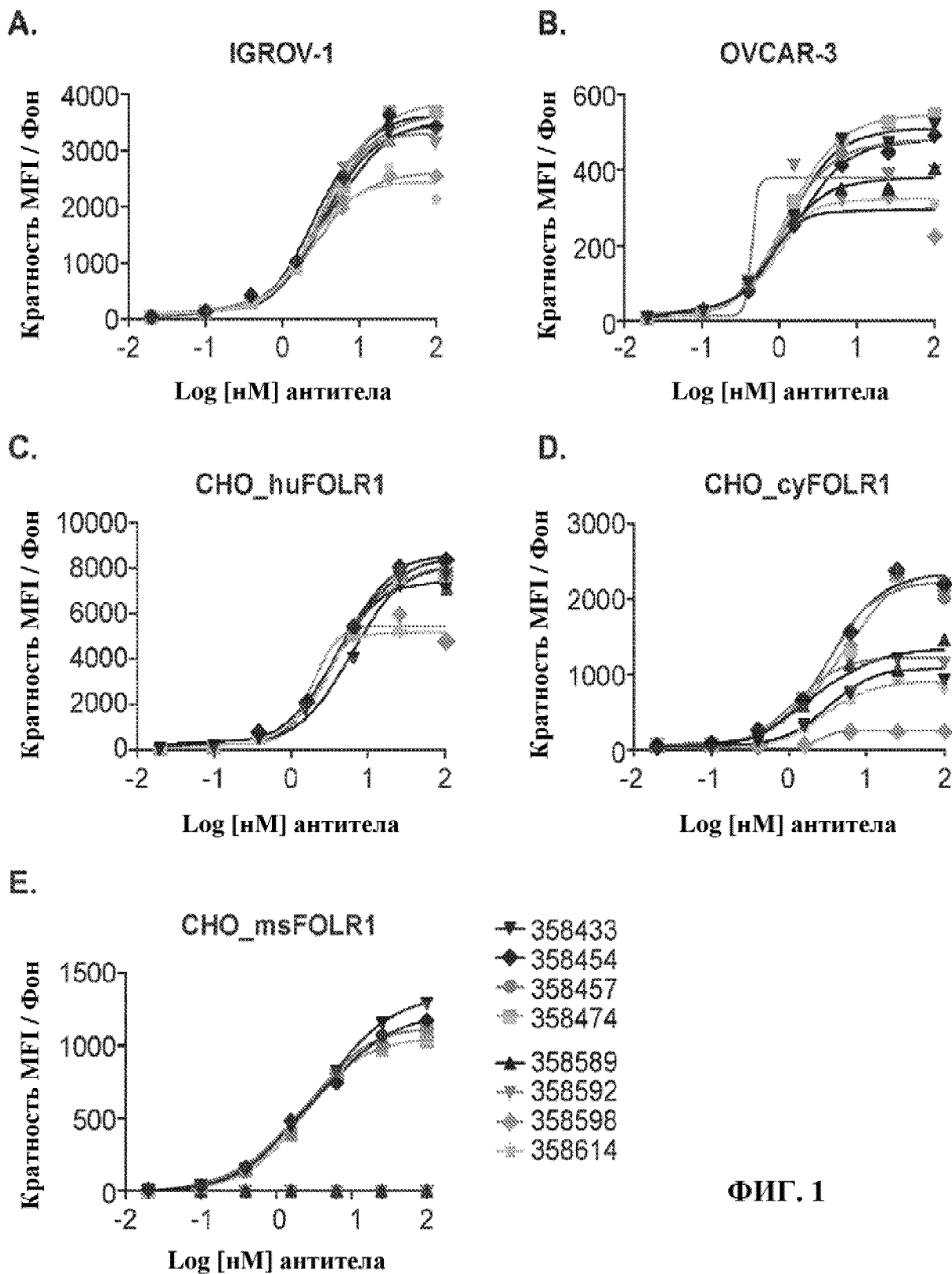
из клетки.

55. Способ получения антитела по любому из пп. 1-45, включающий иммунизацию животного UniRat белком FOLR1 и идентификацию последовательностей FOLR1-связывающих антител.

56. Способ лечения, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективной дозы антитела по любому из пп. 1-45 или фармацевтической композиции по п. 46.

По доверенности

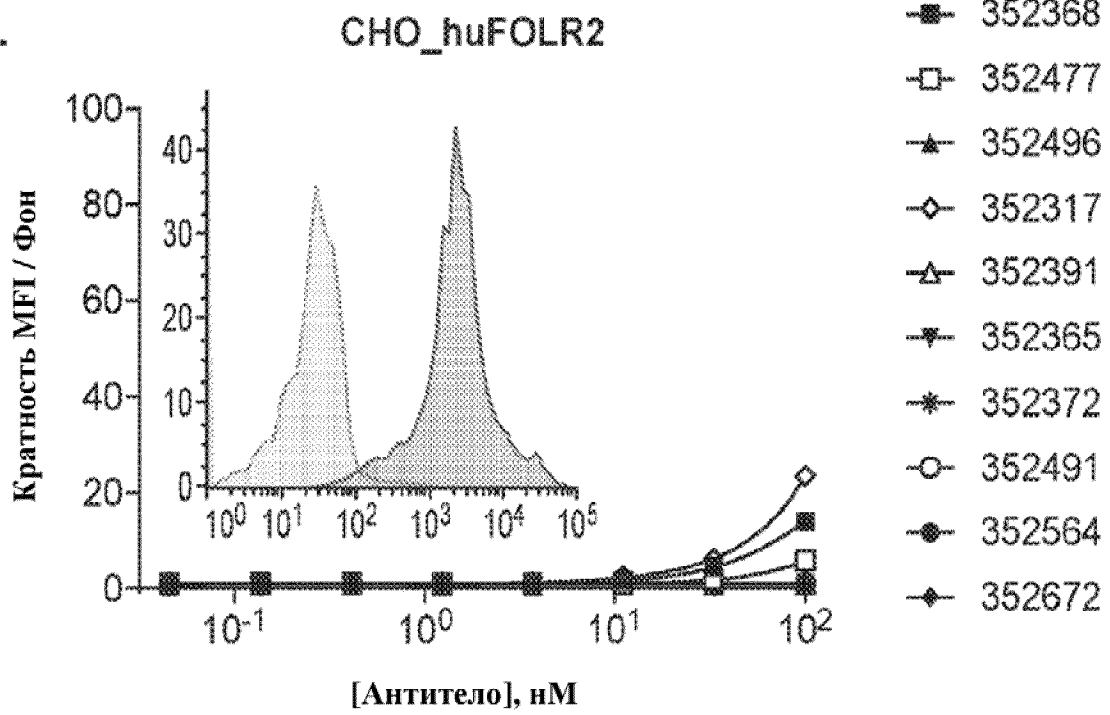
1/23



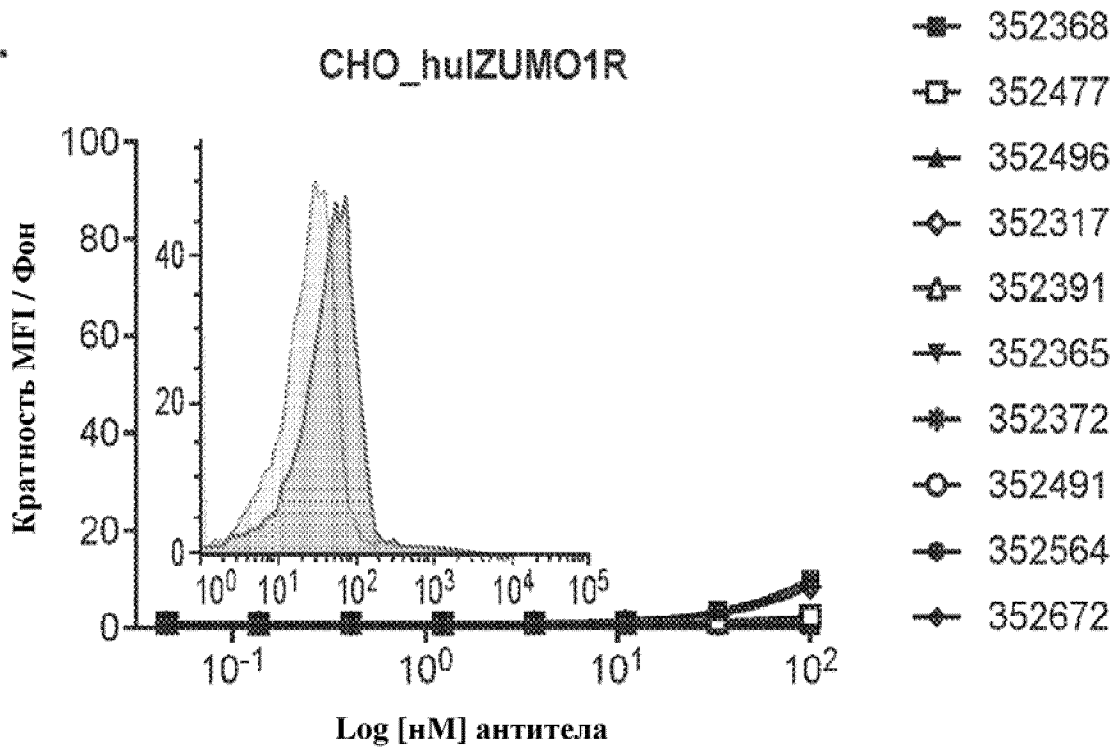
ФИГ. 1



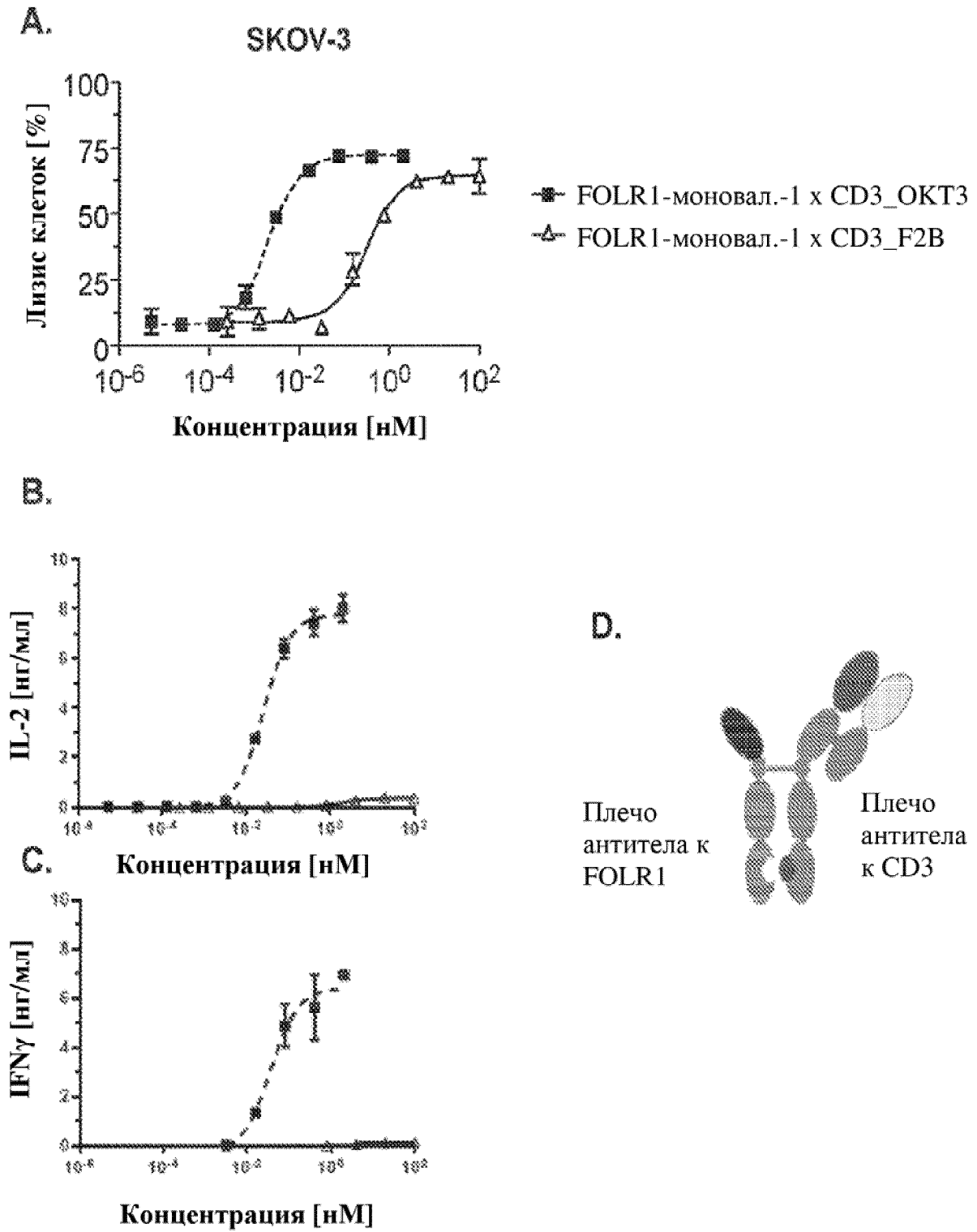
A.



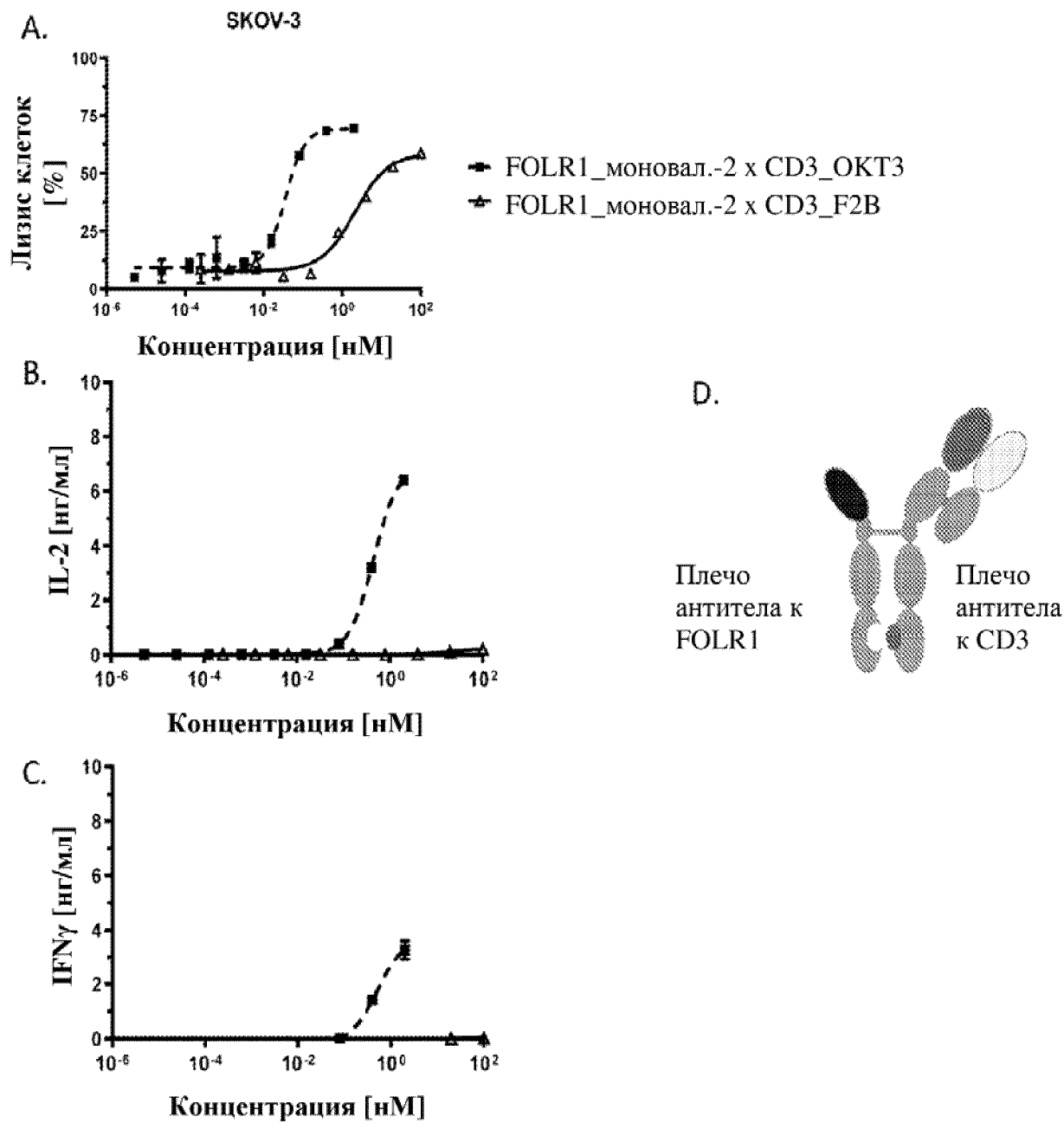
B.



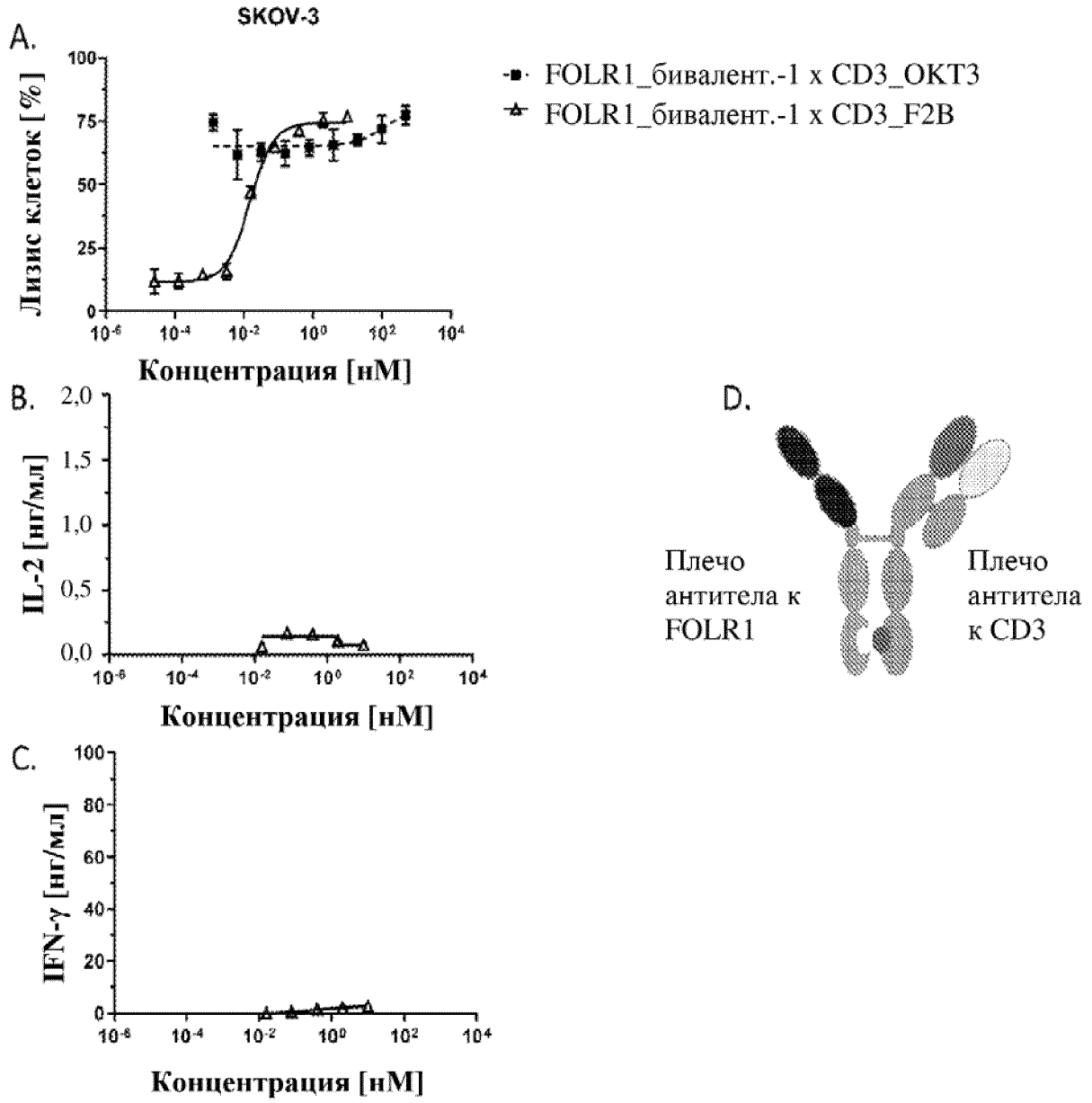
ФИГ. 2



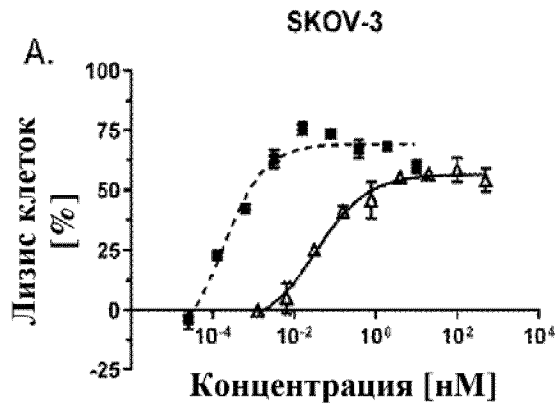
ФИГ. 3



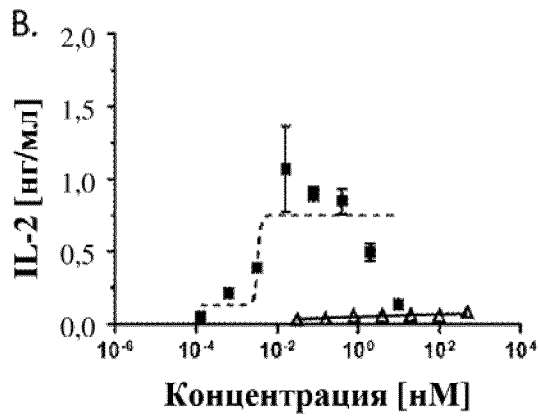
ФИГ. 4



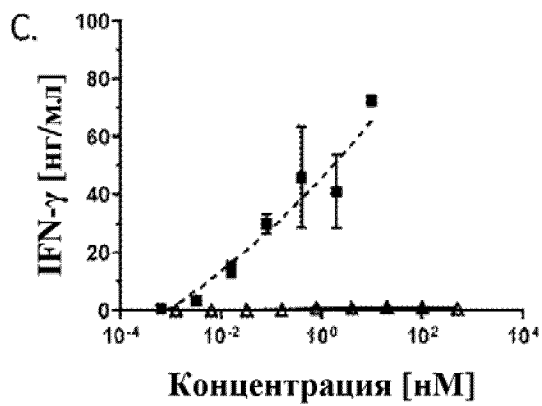
ФИГ. 5



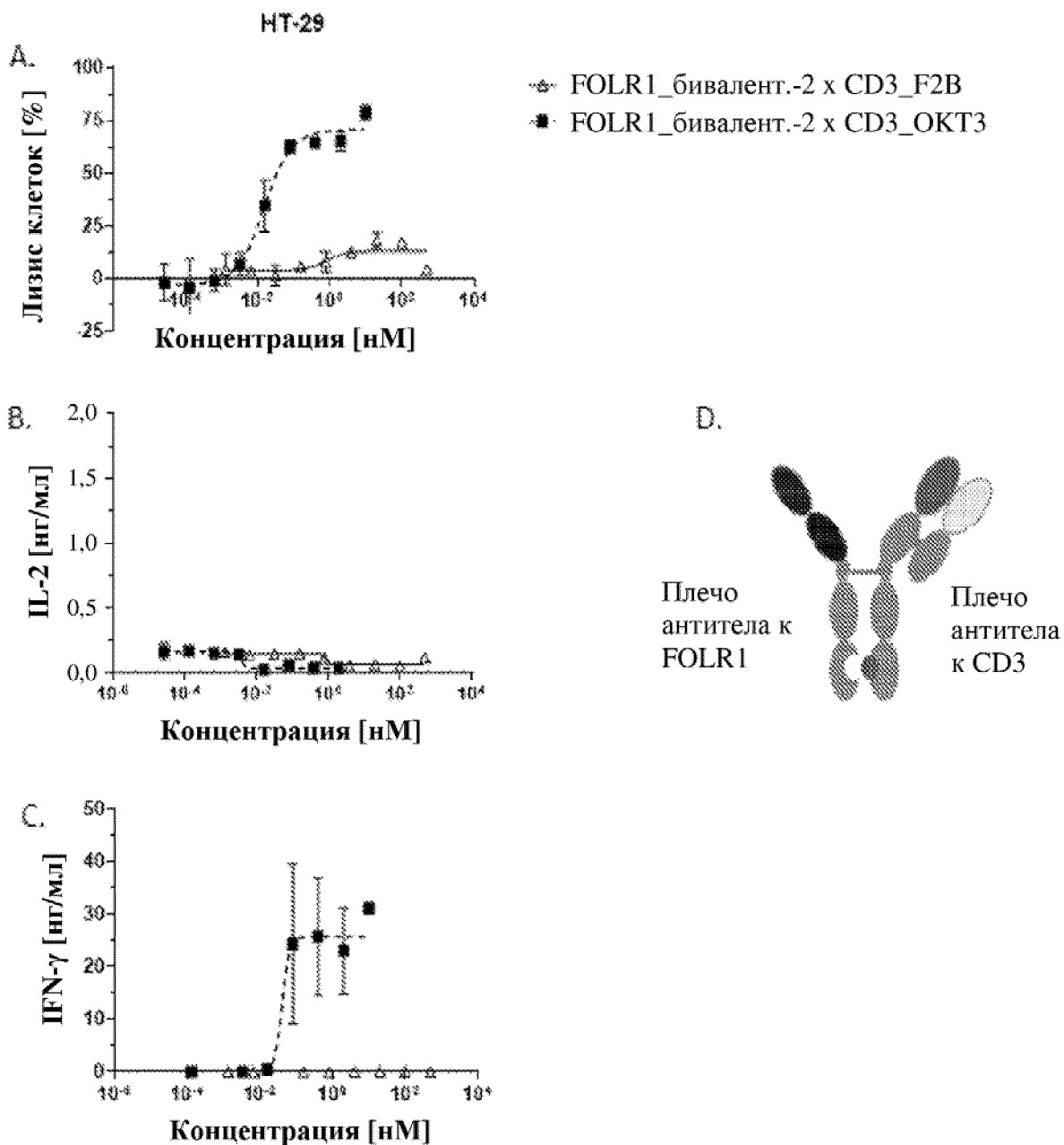
- ▲ FOLR1\_бивалент.-2 x CD3\_F2B
- FOLR1\_бивалент.-2 x CD3\_OKT3



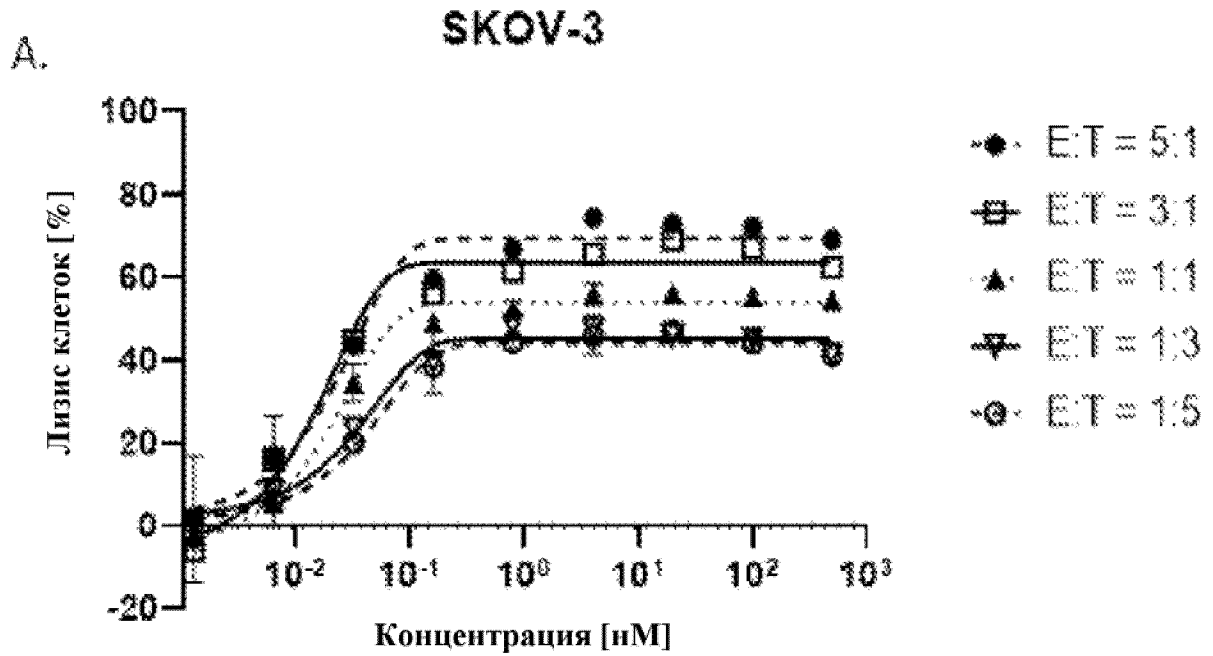
D.



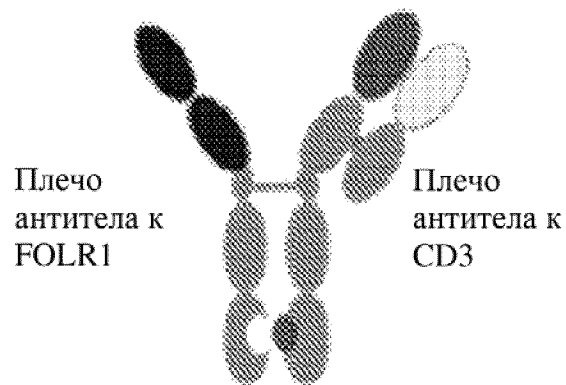
ФИГ. 6



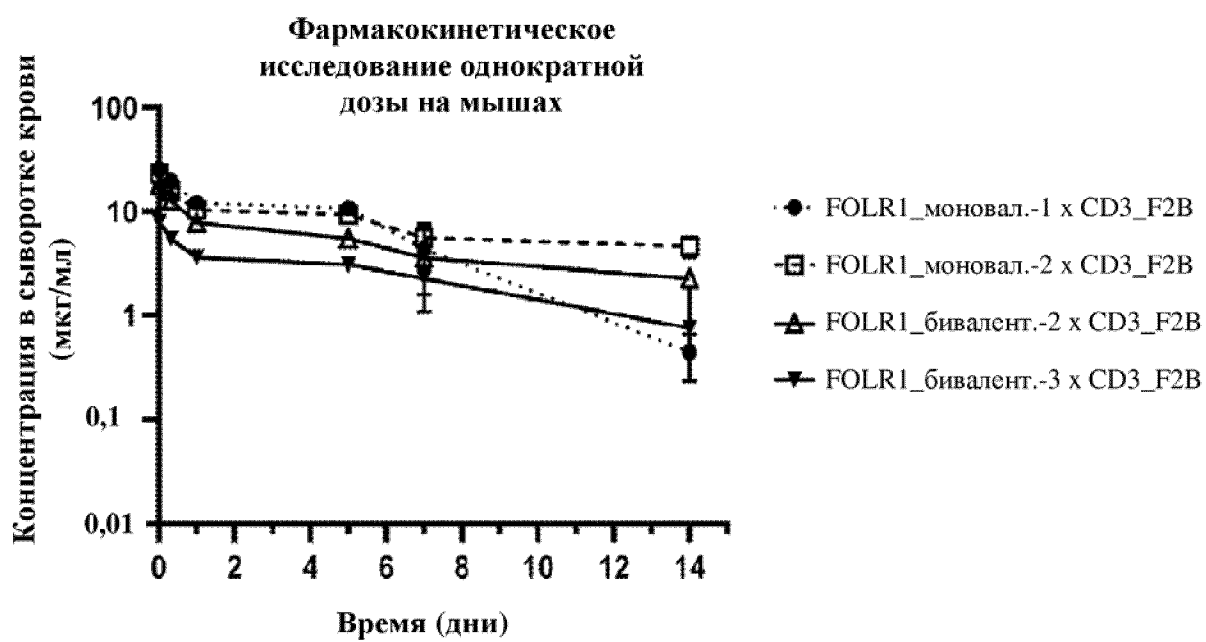
ФИГ. 7



Б.



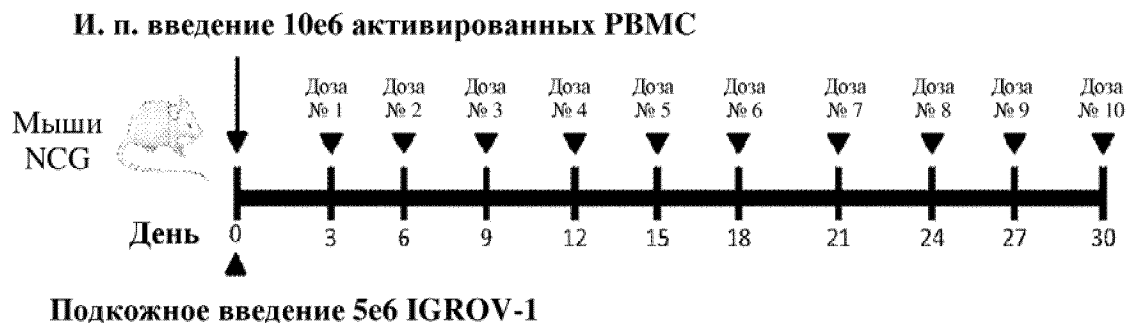
ФИГ. 8



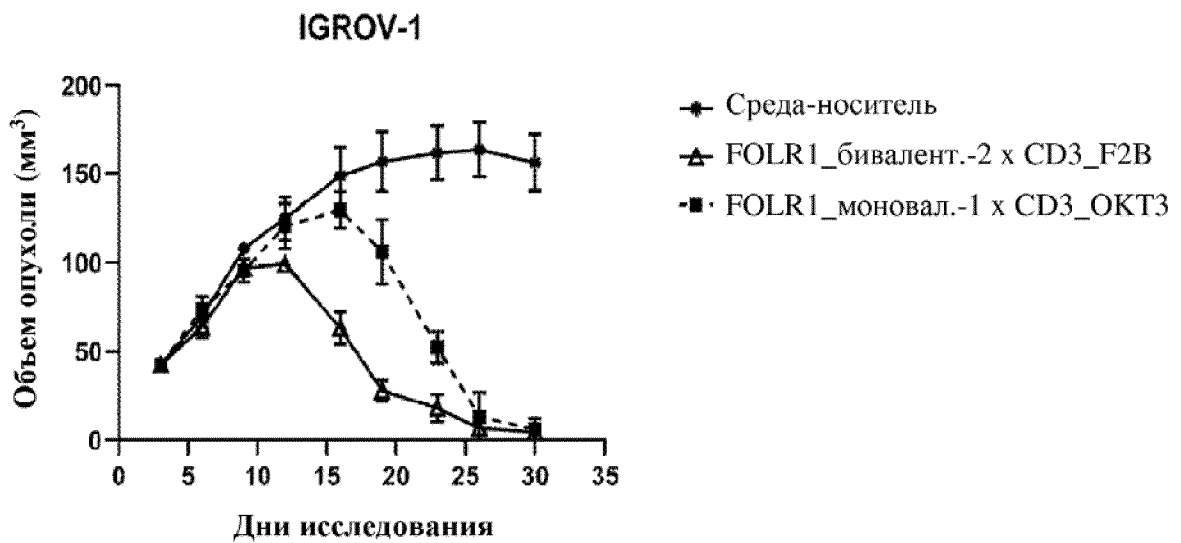
ФИГ. 9



А.



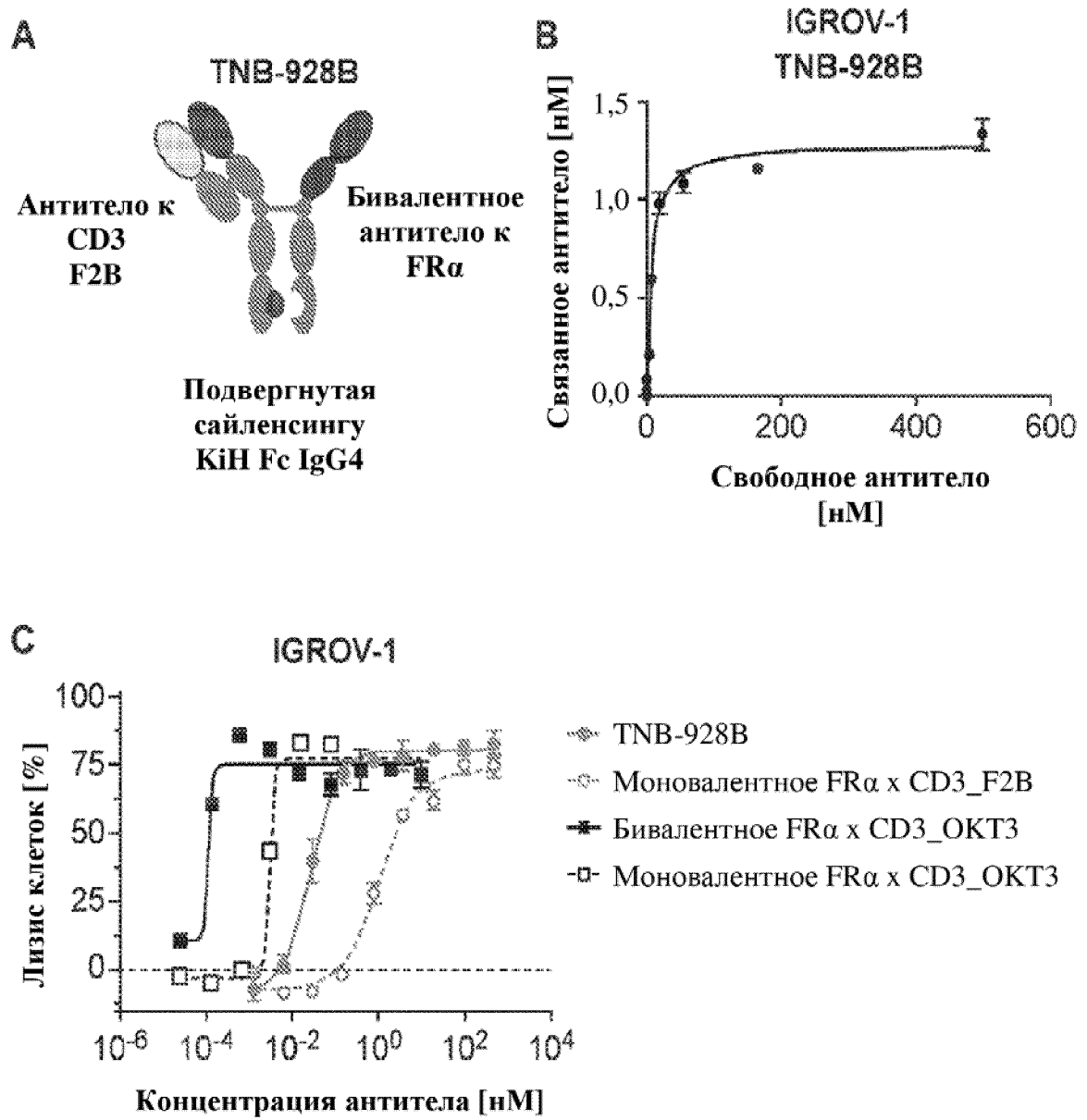
В.



ФИГ. 10

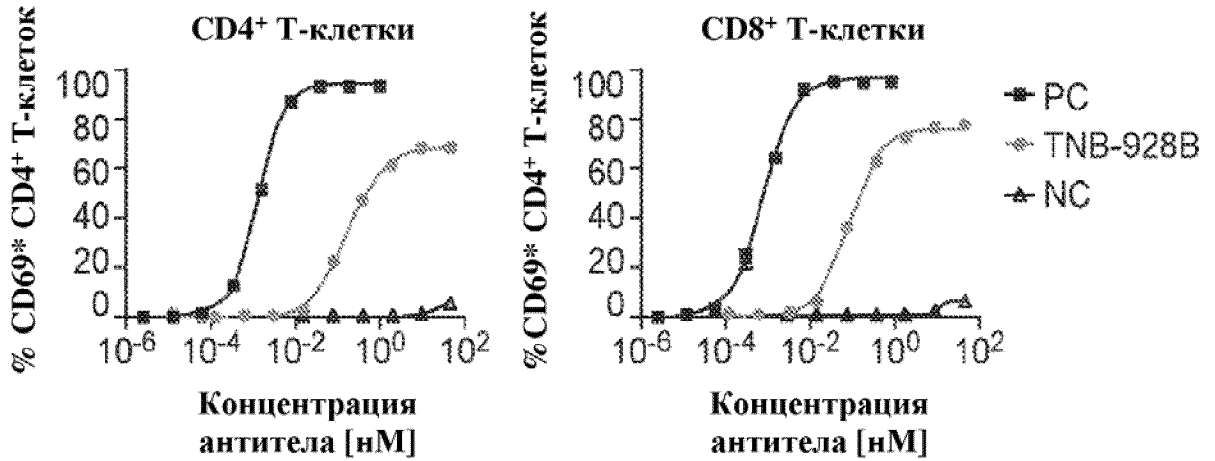
Линия клеток	Плотность антигена FR $\alpha$ ( $\times 10^3$ )
IGROV-1	1871 $\pm$ 838
SKOV-3	82 $\pm$ 29
OVCAR-3	44 $\pm$ 8
HT-29	8 $\pm$ 1
Клетки эпителия сосудистого сплетения	0,7 $\pm$ 0,6
Клетки пигментного эпителия сетчатки	1,3 $\pm$ 0,2
Альвеолярные эпителиальные клетки легких	0,1 $\pm$ 0,1
Бронхиальные эпителиальные клетки	0,8 $\pm$ 0,4
Эпителиальные клетки коры почек	6,7 $\pm$ 1,5

ФИГ. 11

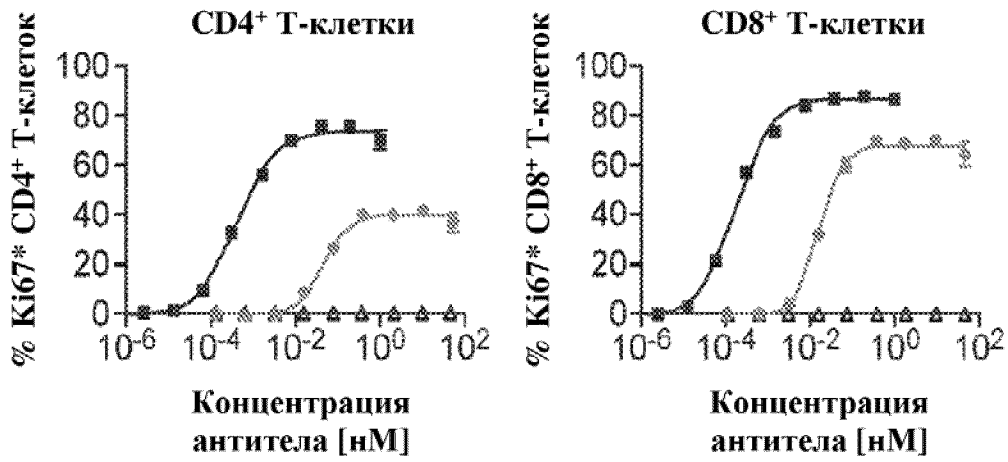


ФИГ. 12

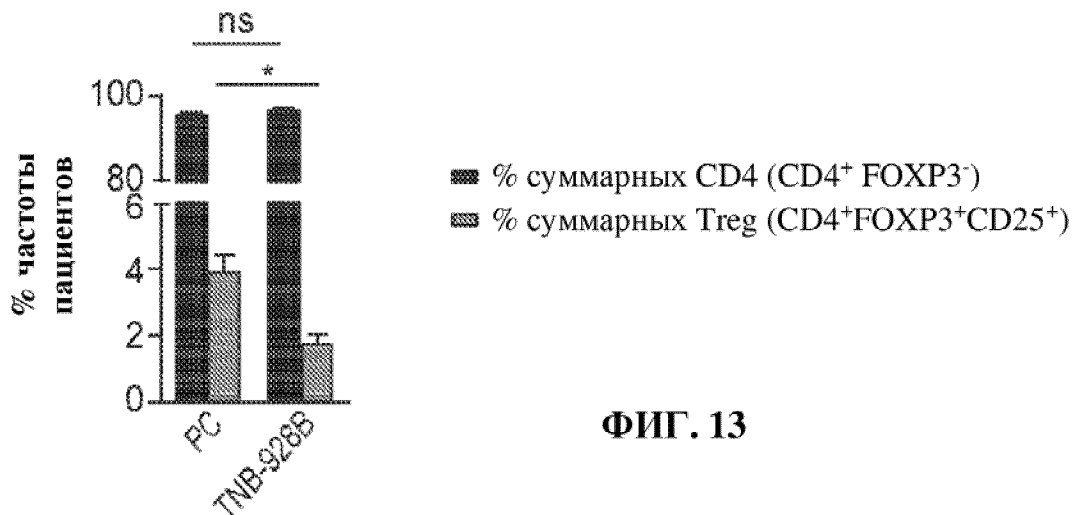
**A**



**B**

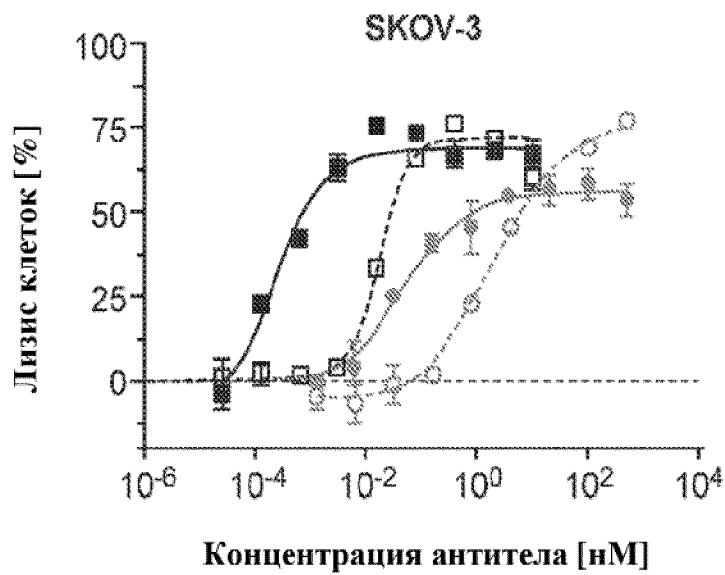


**C**

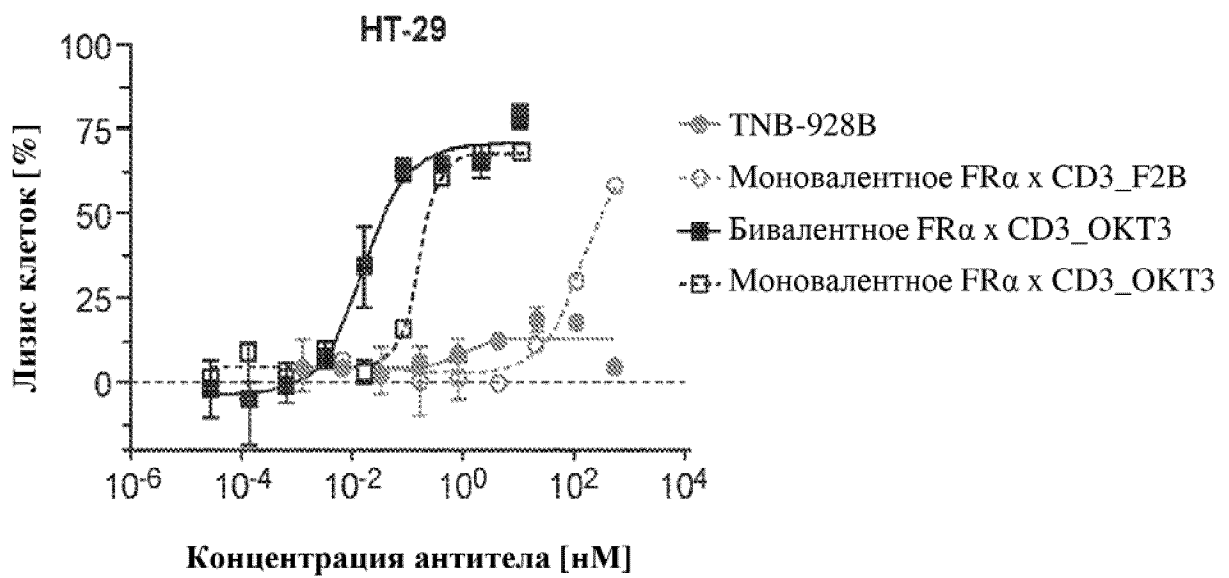


**ФИГ. 13**

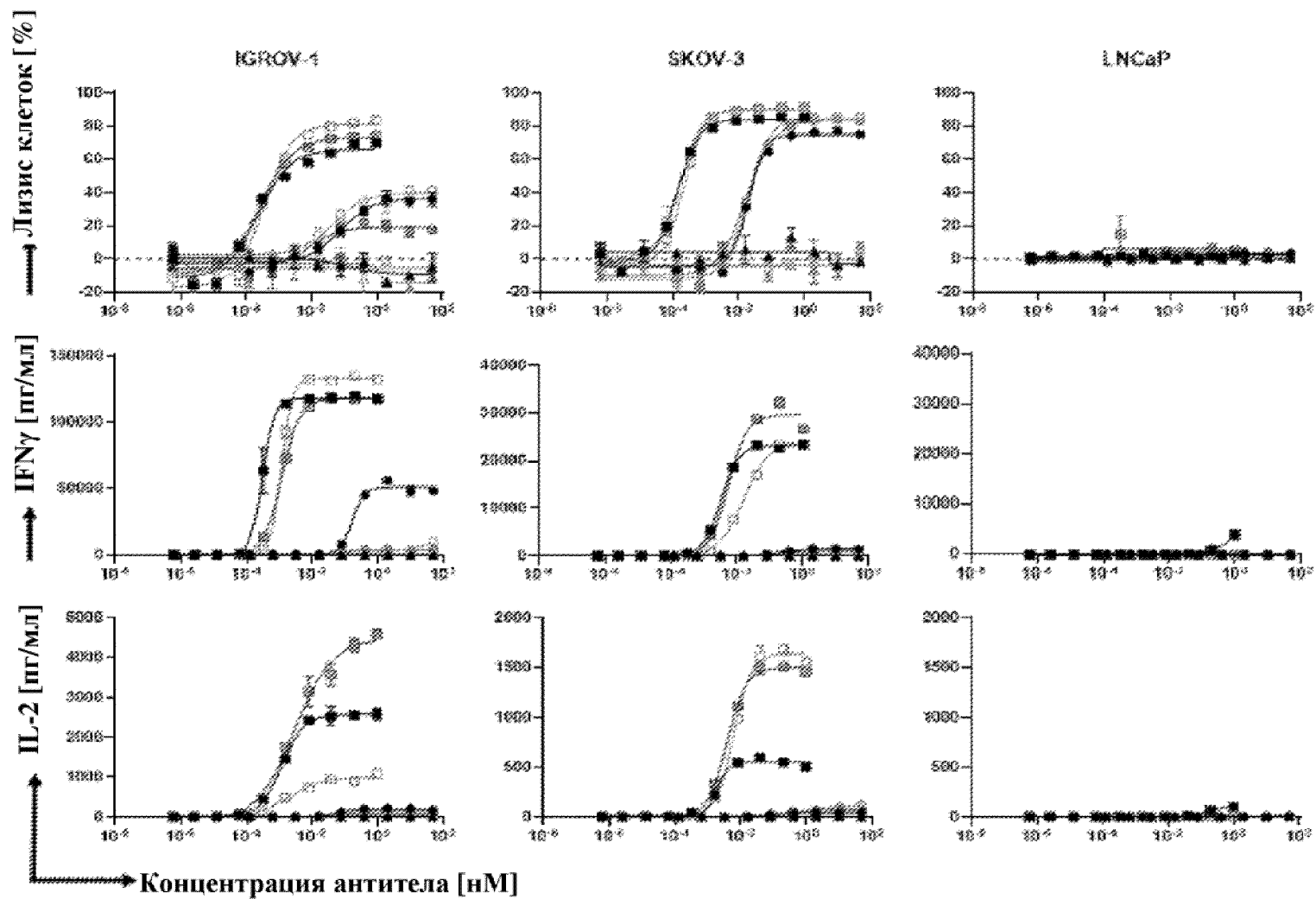
А



Б

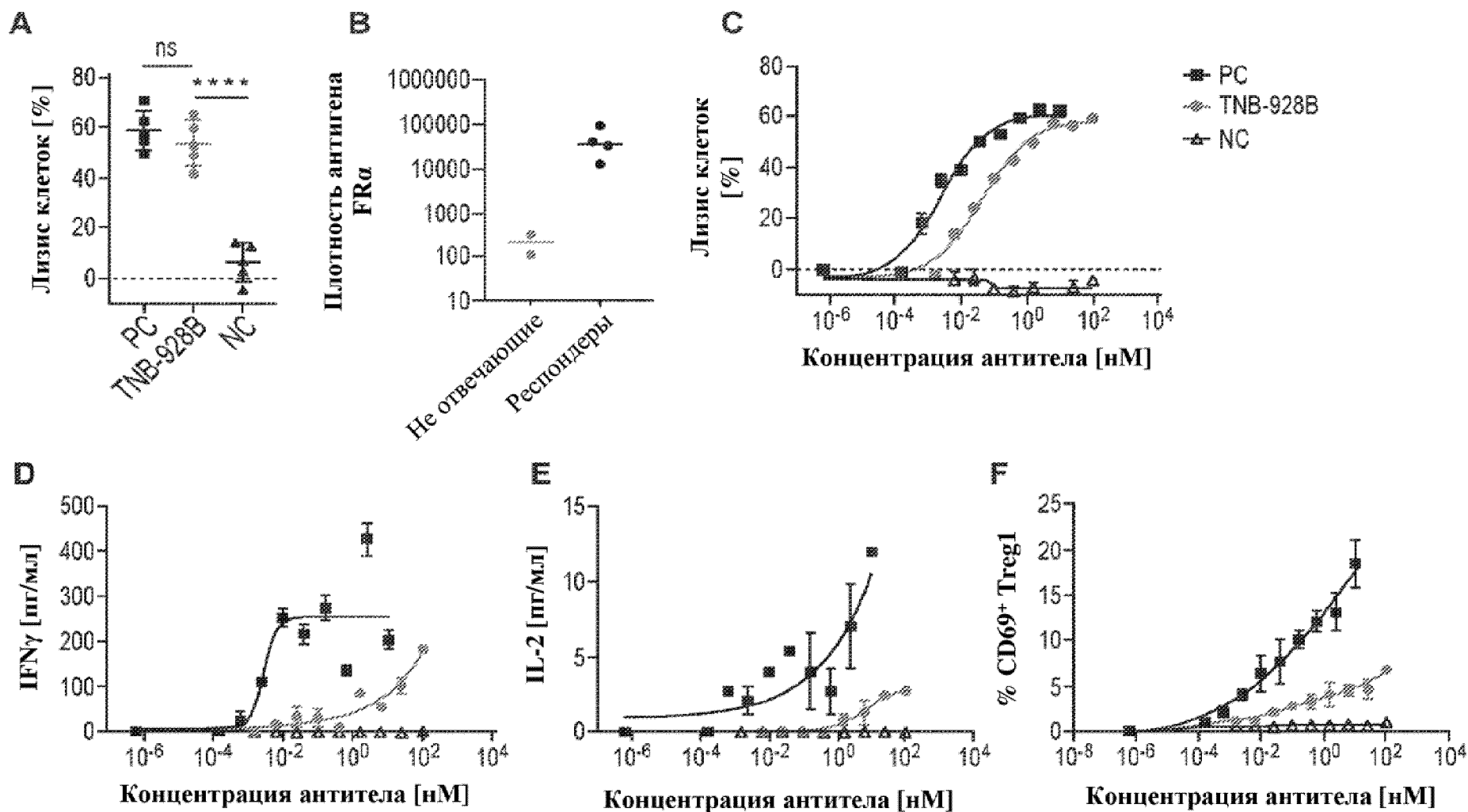


ФИГ. 14

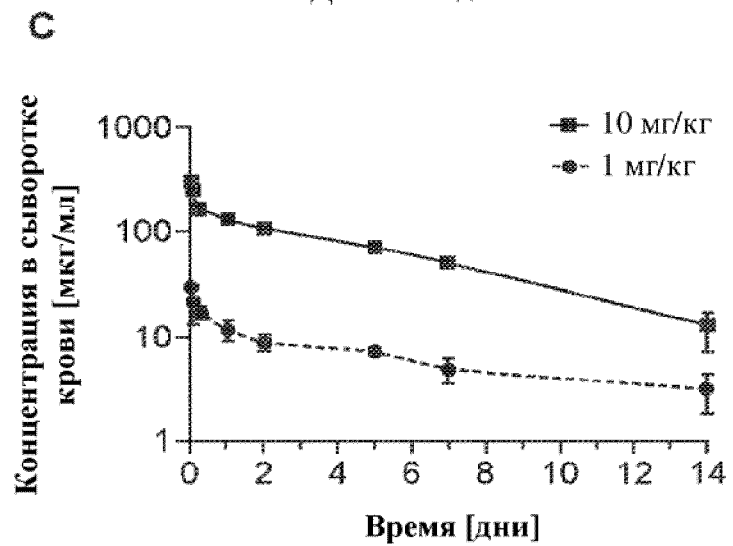
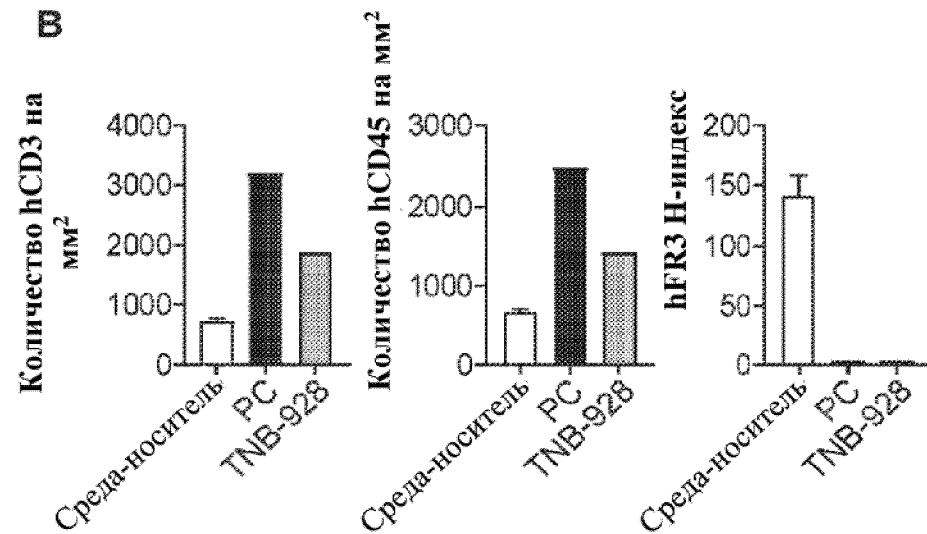
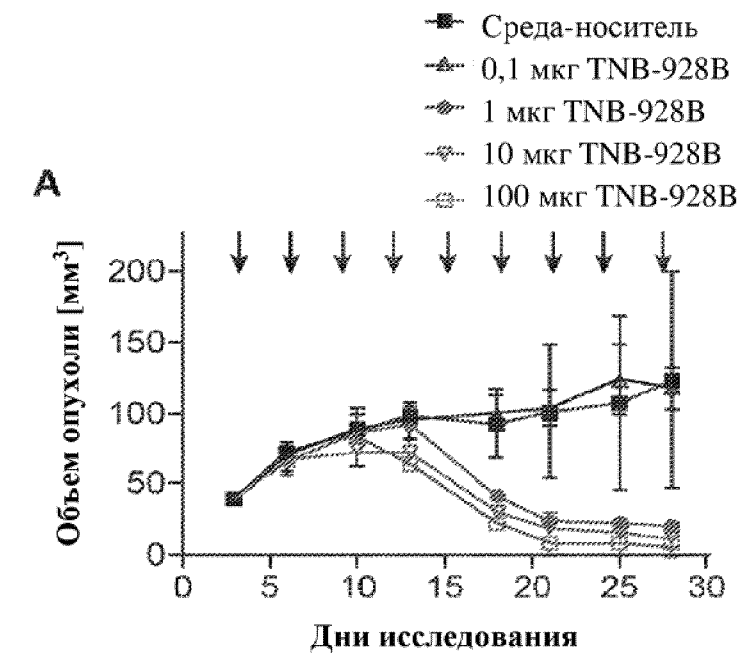


- PC, донор 1      ● TNB-928B, донор 1      ● NC, донор 1
- PC, донор 2      ○ TNB-928B, донор 2      ○ NC, донор 2
- ▨ PC, донор 3      ▨ TNB-928B, донор 3      ▨ NC, донор 3

ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17



День 0		Стабильность при термальном стрессе 4°C День 30		Стабильность при термальном стрессе 37°C День 30	
% LMW	% HMW	% LMW	% HMW	% LMW	% HMW
2,6	2,4	1,3	0,6	1,4	1,0

ФИГ. 18

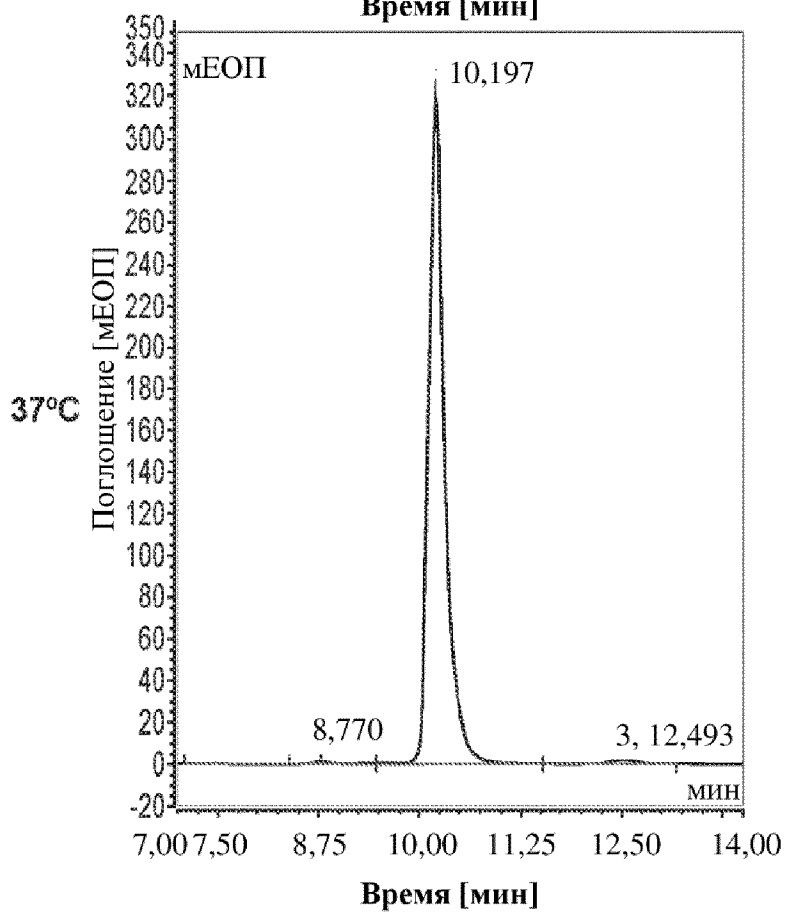
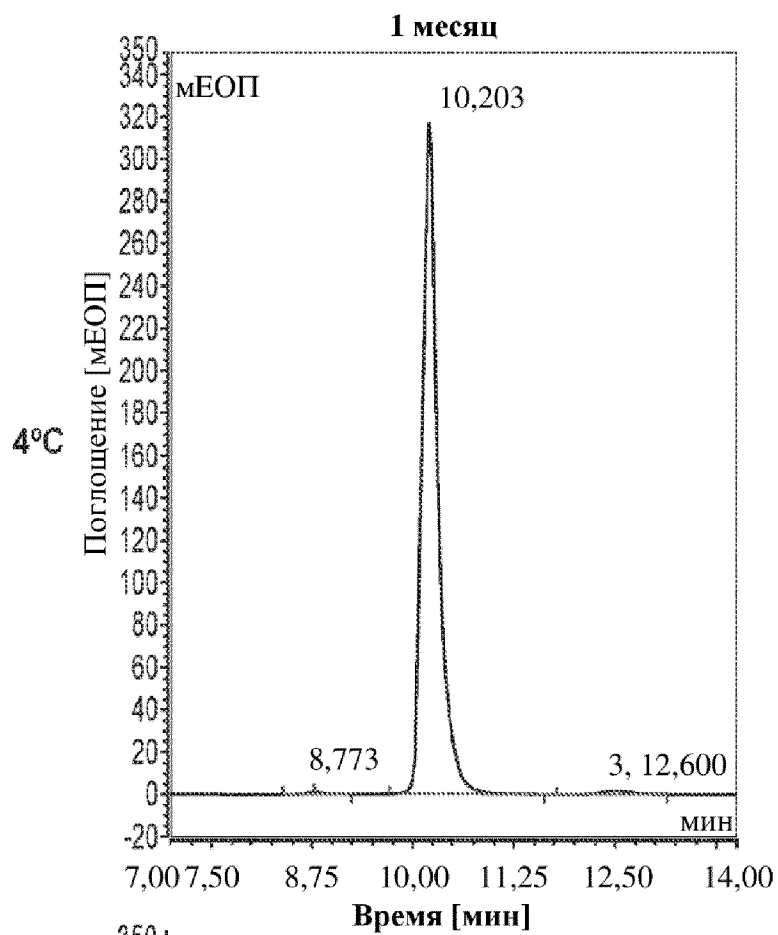
Антитело	EC50 (пМ)	
	IGROV-1	SKOV-3
TNB-928B	28,2	35,3
Моновалентное FR $\alpha$ x CD3_F2B	1093	2178
Бивалентное FR $\alpha$ x CD3_OKT3	0,1	0,2
Моновалентное FR $\alpha$ x CD3_OKT3	3,1	17,8

ФИГ. 19

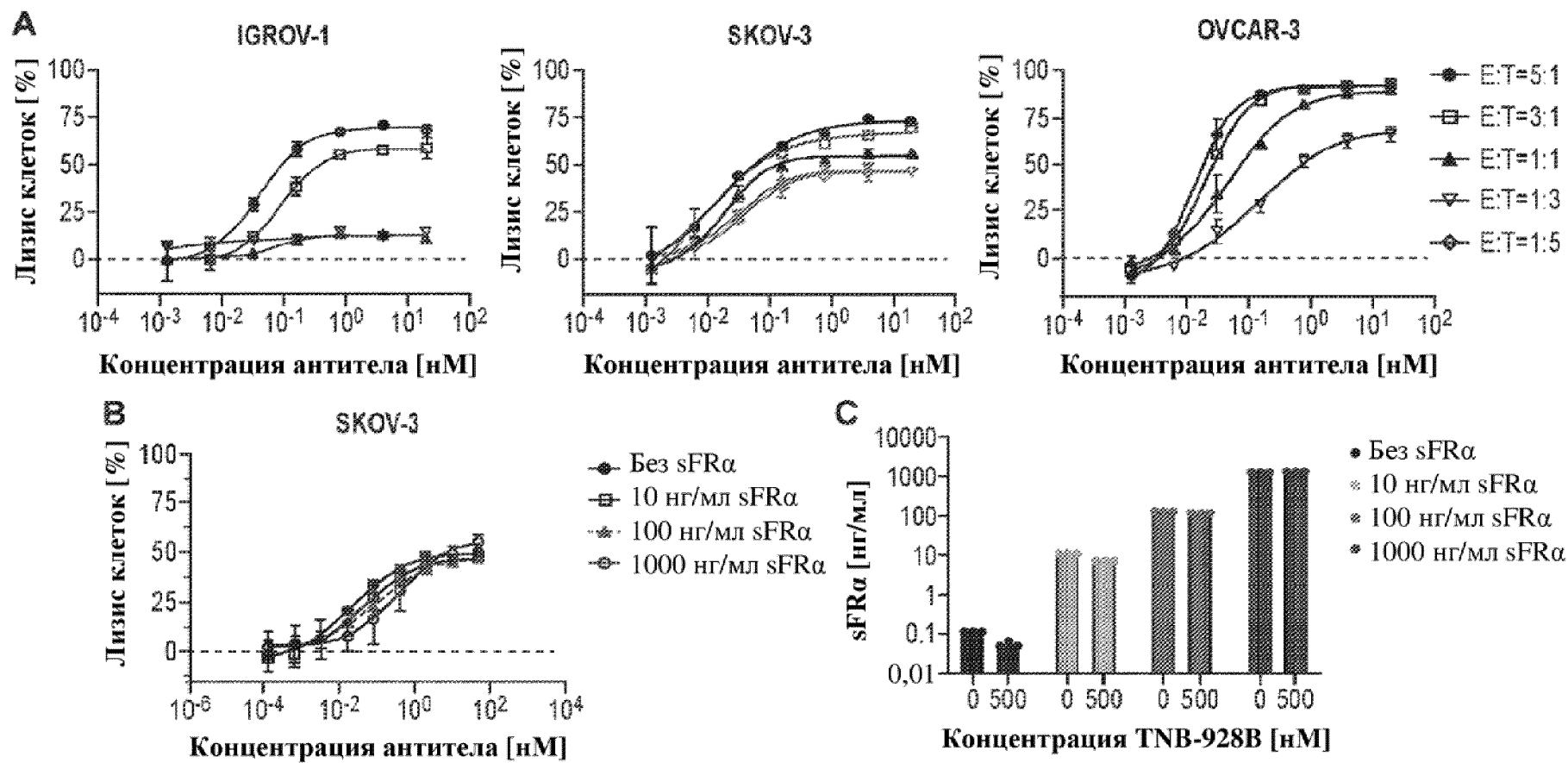
Донор	Тип образца	Возраст	Клиническая стадия	Стадия патологического процесса	Плотность антигена FR $\alpha$ (x 10 <sup>3</sup> )	TNB-928B % макс. лизиса
TB1	HGSC	56	IVB	IIIA1ii	97,9	42,0
TB2	HGC	70	3C		33,1	52,5
TB3	LGESS	51	н.д.		н.о.	Лизис отсутствует
TB4	HGSC	64	4B	IIIB	13,0	60,0
TB5	HGSC	48	3B	IIIB	н.о.	64,9
TB6	HGSC	55		IIIC	0,3	Лизис отсутствует
TB7	LGSC	49		IVB	42,0	49,4
TB8	HGSC	69		IIIC	0,1	Лизис отсутствует

20/23

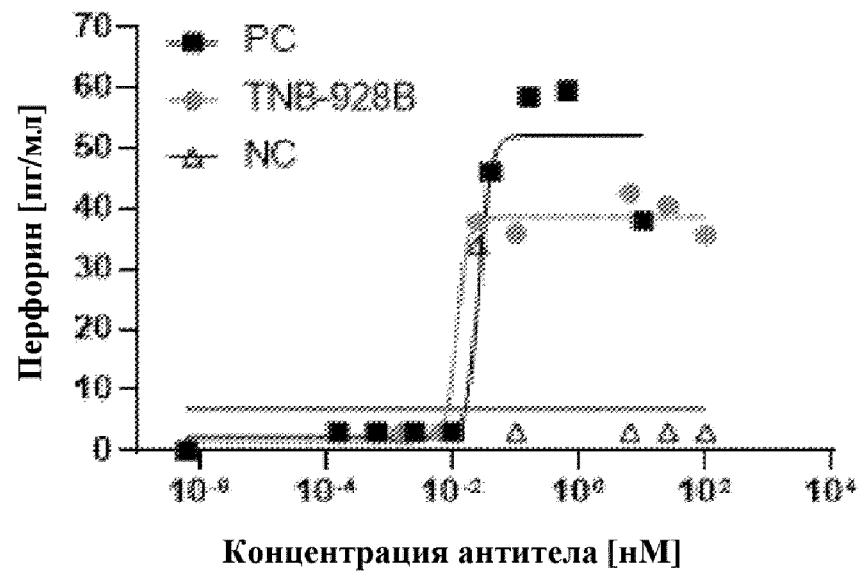
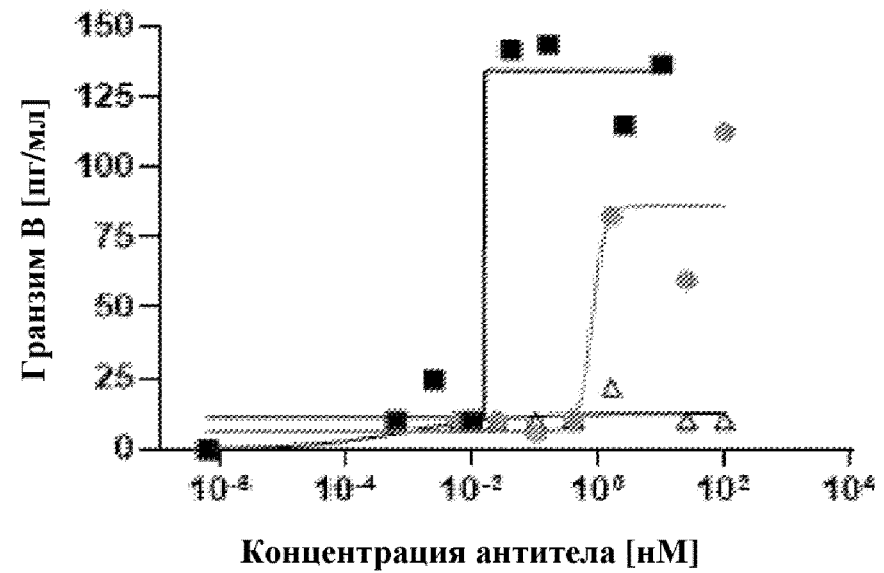
ФИГ. 20



ФИГ. 21



ФИГ. 22

**A****B**

ФИГ. 23