

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392166** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.02

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ИМЕЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬ К ROR1 И CD3

(31) **21154786.4; PCT/EP2021/087618**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.02.02; 2021.12.23**

**Шатгерже Бити, Снелл Даниэль (CH),
Симонин Александр (FR), Гунде Теа,
Хесс Кристиан, Вармут Штефан, Брок
Магтас, Титц Джулия, Йоханссон
Мария, Спига Фабио Марио (CH)**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/052425**

(87) **WO 2022/167460 2022.08.11**

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

НУМАБ ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD), и один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD), где мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное мультиспецифическое антитело, векторам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты, клеткам-хозяевам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты или указанные векторы, и способу получения указанного мультиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное мультиспецифическое антитело, и способам их применения.

202392166

A1

A1

202392166

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578736EA/23

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ИМЕЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬ К ROR1 И CD3

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD), и один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD), где мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное мультиспецифическое антитело, векторам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты, клеткам-хозяевам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты или указанные векторы, и способу получения указанного мультиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное мультиспецифическое антитело, и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Тирозин-протеинкиназный трансмембранный рецептор ROR1 является членом семейства подобных рецепторным тирозинкиназам орфанных рецепторов (ROR). Внеклеточный домен рецептора ROR1 состоит из трех отдельных доменов: дистального относительно мембраны иммуноглобулиноподобного домена, промежуточного домена Frizzled и проксимального к мембране домена Kringle. ROR1 является онкофетальным антигеном, необходимым во время эмбриогенеза. Мыши с гомозиготным нокаутом ROR1 умирают перинатально из-за респираторной дисфункции (Borcherding et al 2014). Экспрессия ROR1 в нормальных тканях взрослых ограничена жировой тканью, некоторыми клетками поджелудочной железы и легких, а также субпопуляции промежуточных В-клеток (Baskar et al 2008; Hudecek et al 2010; Vicocca *et al.*, 2012). Однако он может экспрессироваться на ряде гемобластозов и солидных злокачественных новообразований, а также субпопуляции злокачественных стволовых клеток. Кроме того, в нескольких исследованиях показано, что ROR1 играет важную роль в прогрессировании и метастазировании злокачественного новообразования (см., например, Cui *et al.*, 2013). Таким образом, ROR1 является привлекательной мишенью для опухолеспецифической терапии.

[0003] ROR1 является белком поверхности клетки, опосредующим сигналы через связывание со своими лигандами, которыми, как считают, являются Wnt5a и NKX1-2. Показано, что Wnt5a связывается с доменом Frizzled во внеклеточной части ROR1, и в трансфицированных клетках показано, что он модулирует активацию NF-κB и пролиферацию линий нормальных и опухолевых клеток легких. Показано, что связывание NKX1-2 с ROR1 играет роль в выживании линий клеток рака легких посредством киназа-зависимых и киназа-независимых механизмов.

[0004] Кластер дифференцировки 3 (CD3) является трансмембранным белком типа I, экспрессируемым на поверхности некоторых Т-клеток, необходимым для активации Т-клеток. Он является частью комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) и взаимодействует с другими доменами этого комплекса. У млекопитающих CD3 имеет три разные цепи (γ , δ и ϵ) и цепь ζ (CD247) или цепь ζ/η . CD3- и ζ -цепи вместе с TCR образуют то, что известно как комплекс Т-клеточного рецептора. Показано, что антитела против CD3, например, антитела против CD3 ϵ , индуцируют кластеризацию CD3 на Т-клетках, что вызывает активацию Т-клеток.

[0005] Некоторые биспецифические антитела против ROR1 и CD3 описаны на современном уровне техники.

[0006] Например, в WO2017/127499 (A1) описывают биспецифические антитела против ROR1 \times CD3, то есть молекулы DuoBody®, специфически связывающиеся с Ig-подобным доменом, доменом Frizzled или доменом Kringle внеклеточного домена ROR1. Молекулы DuoBody® демонстрируют значения EC₅₀ в диапазоне от 0,2 до 17 нМ для направляемого Т-клетками уничтожения ROR1-экспрессирующих модифицированных клеток SK-MES-1 с максимальным уничтожением, как правило, в диапазоне от 20 до 40%. Улучшенные биспецифические молекулы DuoBody® против ROR1 \times CD3 D1 и ROR1 \times CD3 D2 демонстрируют значения EC₅₀ в диапазоне от 0,2 до 1 нМ для направляемого Т-клетками уничтожения экспрессирующих ROR1 злокачественных клеток MAVER-1, JeKo-1 и Z-138, как правило, с максимальным уничтожением ниже 50%.

[0007] В WO2017/142928 (A1) описывают биспецифические антитела против ROR1 \times CD3, состоящие из двух перекрестно сшитых и стабилизированных дисульфидными связями F ν -связывающих доменов, имеющих специфичность к двум антигенам-мишеням, и соединенных с Fc-областью иммуноглобулина (формат DART®). Дополнительно описаны анализы направляемой Т-клетками цитотоксичности для нескольких из этих антител DART против разных ROR1-экспрессирующих линий злокачественных клеток. Значения EC₅₀ для уничтожения этих злокачественных клеток, как правило, находятся в диапазоне от 10 до 100 пМ с максимальным уничтожением от 10 до 40%, за некоторыми исключениями. Однако показан только один пример, в котором максимальное уничтожение хоть сколько-нибудь выше 60%. У лучшего антитела DART DART-D зарегистрированы значения EC₅₀ в диапазоне от 1,3 до 56 пМ.

[0008] В WO2019/008379 (A1) описывают биспецифические ViTE против ROR1 \times CD3, то есть биспецифические антитела, состоящие из двух scFv-фрагментов, соединенных коротким линкером. Лучшим примером ViTE является клон F, демонстрирующий значимую цитотоксичность ROR1-положительных клеток нейробластомы B-1643 и B-7 в концентрациях 0,01 мкг/мл.

[0009] В WO2020/237173 (A1) описывают биспецифические антитела против ROR1 \times CD3, имеющие пять разных биспецифических конфигураций на основе IgG. 20 из этих биспецифических антител на основе IgG получали и анализировали на интернализацию и их способность индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение

различных ROR1-экспрессирующих злокачественных клеток. Все 20 конструкций интернализировались, хотя и с разными скоростями. 20 конструкций демонстрируют значения EC_{50} для опосредованного Т-клетками уничтожения указанных ROR1-экспрессирующих злокачественных клеток, как правило, в диапазоне от нескольких пМ до 50 пМ, с максимальным уничтожением от 10 до 50%. Зарегистрирован только один пример, в котором максимальное уничтожение превышает 60%.

[0010] В WO2014/167022 (A1) и последующей патентной заявке WO2016/055592 (A1) описывают биспецифические антитела, содержащие один Fab-фрагмент, специфически связывающийся с CD3ε человека, и один или два дополнительных Fab-фрагмента, специфически связывающиеся с внеклеточным доменом ROR1 человека, где указанные биспецифические антитела демонстрируют низкую скорость интернализации в клеточном анализе. Конструкции биспецифических антител, являющиеся моновалентными или бивалентными для ROR1 и содержащие Fc-область иммуноглобулина, приведены в качестве примеров и подвергнуты экспериментам по интернализации. Результаты экспериментов по интернализации свидетельствуют о том, что конструкции антител, являющиеся бивалентными по ROR1, демонстрируют более быструю интернализацию в первичных клетках В-CLL, чем соответствующие конструкции антител, являющиеся моновалентными по ROR1. Анализы направляемой Т-клетками цитотоксичности с использованием этих биспецифических антител против ROR1-экспрессирующих клеток-мишеней RPMI8226 MM демонстрируют максимальный лизис клеток-мишеней от 30 до 40% при концентрации антитела 100 пМ. В WO2016/055592 (A1) дополнительно описывают анализы направляемой Т-клетками цитотоксичности с использованием улучшенного антитела Mab2-TCBcv, являющегося бивалентным по ROR1, тестируемым против нескольких клеток-мишеней, экспрессирующих разные уровни ROR1. Данные свидетельствуют о том, что Mab2-TCBcv демонстрирует максимальный лизис клеток-мишеней от 20 до 50% в случае Colo-704 и клеток рака яичника OVCAR-5, экспрессирующих средние уровни ROR1, и максимальный лизис клеток-мишеней 20% в случае клеток рака яичника SKOV-3, экспрессирующих низкие уровни ROR1.

[0011] Как очевидно из приведенных выше ссылок, известные на предшествующем уровне техники антитела против ROR1×CD3 зачастую демонстрируют значимо сниженную активность против злокачественных клеток, экспрессирующих низкие уровни ROR1. Кроме того, эти известные на предшествующем уровне техники антитела, как правило, демонстрируют низкий процент максимального уничтожения - зачастую гораздо ниже 50% - в анализах цитотоксичности против многих ROR1-экспрессирующих злокачественных клеток, в частности, против злокачественных клеток с низкой экспрессией ROR1, что свидетельствует о том, что их механизм действия не является идеальным.

[0012] Таким образом, существует очевидная потребность в новых и улучшенных терапевтических антителах против ROR1×CD3.

[0013] Указанные терапевтические антитела должны иметь высокую активность против злокачественных клеток с высокой экспрессией ROR1, а также против

злокачественных клеток, экспрессирующих ROR1 на более низких уровнях. Кроме того, они должны демонстрировать приемлемый процент максимального уничтожения, например, 40% и более, в случае этих злокачественных клеток. В то же время, они должны демонстрировать переносимый профиль безопасности, чтобы держать дозолимитирующие побочные эффекты на низком уровне. Кроме того, желательно, чтобы указанные терапевтические антитела имели превосходные биофизические свойства, такие как высокая стабильность, для облегчения возможности разработки и производства с высоким выходом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0014] Целью настоящего изобретения является предоставление лекарственного средства для улучшения лечения злокачественных новообразований, экспрессирующих ROR1. В частности, целью настоящего изобретения является предоставление новых и улучшенных терапевтических антител, также способных эффективно приводить к эрадикации злокачественных клеток, экспрессирующих низкие уровни ROR1. Дополнительной целью настоящего изобретения является идентификация антител против ROR1×CD3, имеющих улучшенный механизм действия, то есть демонстрирующих высокий процент максимального уничтожения в анализах цитотоксичности против ROR1-экспрессирующих злокачественных клетках. Указанные новые и улучшенные терапевтические антитела должны дополнительно демонстрировать переносимый профиль безопасности, то есть не должны влиять на здоровые клетки или не должны вызывать дозолимитирующие токсичности посредством системной активации Т-клеток через неспецифическое связывание с CD3.

[0015] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что мультиспецифические антитела, содержащие один или два связывающих домена, специфически нацеленных на ROR1 (ROR1-BD), и один связывающий домен, специфически нацеленный на CD3 (CD3-BD), как определено в настоящем описании, в частности, связывающие домены, отличающиеся конкретными характеристиками последовательности, демонстрируют неожиданно высокую активности при уничтожении злокачественных клеток, экспрессирующих ROR1 на уровнях от высоких до низких. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что указанные мультиспецифические антитела, содержащие один ROR1-BD, как определено в настоящем описании, как правило, демонстрируют максимальное уничтожение 60% и выше в анализах направляемой Т-клетками цитотоксичности против злокачественных клеток, экспрессирующих ROR1 на уровнях от высоких до низких.

[0016] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

а) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и

б) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);

где

- мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина;

- указанные ROR1-BD содержат независимо друг от друга набор

последовательностей CDR, выбранных из набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 1,
последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2,
последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 3,
последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 4,
последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 5, и
последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 6;
и/или набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 13 или 14,
последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 15,
последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 16,
последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 17,
последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 18, и
последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 19;

- указанный CD3-BD содержит набор последовательностей CDR, состоящий из
последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 30,
последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 31,
последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 32,
последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 33,
последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 34, и
последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 35.

[0017] Во втором аспекте настоящее изобретение относится к специфическим ROR1-связывающим доменам.

[0018] В третьем аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте или двум нуклеиновым кислотам, кодирующим мультиспецифическое антитело или специфический ROR1-связывающий домен по настоящему изобретению.

[0019] В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к вектору или двум векторам, содержащим нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению.

[0020] В пятом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину или клеткам-хозяевам, содержащим вектор или два вектора по настоящему изобретению.

[0021] В шестом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, включающему (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот по настоящему изобретению или вектора или двух векторов по настоящему изобретению, экспрессирующих указанную нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, или указанного вектора или векторов и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного специфического связывающего домена из системы экспрессии, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по настоящему изобретению, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного мультиспецифического антитела или

указанного специфического связывающего домена из культуры клеток.

[0022] В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

[0024] В девятом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу по настоящему изобретению для применения в лечении заболевания, более конкретно - заболевания человека, выбранного из злокачественного новообразования, в частности злокачественного новообразования, экспрессирующего ROR1.

[0025] В десятом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, в частности, заболевания человека, более конкретно - заболевания человека, выбранного из злокачественного новообразования, включающему стадию введения мультиспецифического антитела по настоящему изобретению нуждающемуся в этом пациенту.

[0026] Аспекты, полезные признаки и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, обобщенные в следующих пунктах, соответственно, в отдельности или в комбинации, дополнительно способствуют решению задачи по изобретению:

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и

б) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);

где

- указанные ROR1-BD содержат независимо друг от друга набор последовательностей CDR, выбранный из набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 1,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 3,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 4,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 5, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 6;

и/или набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 13 или 14,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 15,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 16,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 17,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 18, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 19;

- указанный CD3-BD содержит набор последовательностей CDR, состоящий из последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 30, последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 31, последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 32, последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 33, последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 34, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 35.

2. Мультиспецифическое антитело по п.1, где мультиспецифическое антитело содержит:

а) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и

б) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);

где

- указанные ROR1-BD содержат независимо друг от друга набор последовательностей CDR, выбранный из набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 1,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 3,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 4,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 5, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 6;

или набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 13 или 14,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 15,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 16,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 17,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 18, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 19;

- указанный CD3-BD содержит набор последовательностей CDR, состоящий из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 30,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 31,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 32,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 33,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 34, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 35.

3. Мультиспецифическое антитело по п.1 или 2, где указанное мультиспецифическое антитело имеет один или более из следующих признаков 1)-3):

1) указанное мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина;

- 2) указанное мультиспецифическое антитело не содержит области CH1 и/или CL;
- 3) указанное мультиспецифическое антитело является гуманизированным, в частности, указанное мультиспецифическое антитело является гуманизированным и содержит полученные из кролика CDR.

4. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный один или два ROR1-BD связываются с Ig-подобным доменом ROR1 и/или не блокируют связывание Wnt5 α с ROR1.

5. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где, если указанное мультиспецифическое антитело содержит два ROR1-BD, указанные два ROR1-BD содержат два разных набора CDR, то есть один ROR1-BD содержит CDR SEQ ID NO: 1-6, а другой ROR1-BD содержит CDR SEQ ID NO: 13/14-19, или указанные два ROR1-BD содержат одинаковые наборы CDR, то есть оба ROR1-BD содержат CDR SEQ ID NO: 1-6 или CDR SEQ ID NO: 13/14-19, в частности, указанные два ROR1-BD содержат одинаковые наборы CDR.

6. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело является триспецифическим.

7. Мультиспецифическое антитело по п.6, где указанное мультиспецифическое антитело содержит один связывающий домен, специфически связывающийся с сывороточным альбумином человека (hSA-BD).

8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело является триспецифическим и тривалентным или триспецифическим и тетравалентным.

9. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где формат указанного мультиспецифического антитела выбран из группы, состоящей из: tandemного три-scFv (тройного антитела); триатела; scDb-scFv; tandemного три-scFv или scDb-scFv, слитого с N- и/или C-концом домена гетеродимеризации, иного, чем гетеродимерные Fc-домены; и MATCH.

10. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где формат указанного мультиспецифического антитела выбран из scDb-scFv, scMATCH3, MATCH3 и MATCH4.

11. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где каждый из указанных одного или двух ROR1-BD, если находится в формате scFv:

а. связывается с внеклеточным доменом ROR1 человека с моновалентной константой диссоциации (K_D) от 1 пМ до 2 нМ, в частности, с K_D от 1 пМ до 1 нМ, в частности, от 1 до 500 пМ, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

б. связывается с экспрессирующими ROR1 человека клетками MDA-MB-231 с EC_{50} от 5 пМ до 10 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 5 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 4 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 3 нМ;

с. имеет температуру плавления (T_m), определенную посредством

дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 58°C, в частности, по меньшей мере 59°C, в частности, по меньшей мере 60°C, в частности, по меньшей мере 61°C, в частности, где указанные scFv составляют в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

d. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 3%, в частности, менее 2%, в частности, менее 1%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4; и/или

e. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 40°C менее 10%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4; и/или

f. имеет потерю содержания белка после хранения в течение четырех недель при 4°C или 40°C менее 1%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4.

12. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат каркасные последовательности домена VH1a, VH1b, VH3 или VH4 FR1-FR4; в частности каркасные последовательности домена VH3 или VH4 FR1-FR4; в частности каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4.

13. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD дополнительно имеют один или оба из следующих признаков 1) и 2):

1) домен VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3, выбранные из подтипов V_κ, в частности подтипов V_κ1 и V_κ3, в частности, принадлежащие подтипу V_κ1, и каркас FR4, выбранный из V_λ FR4, в частности, является V_λ FR4, содержащим аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности в отношении любой из SEQ ID NO: 76-83, более конкретно, V_λ FR4, выбранным из любой из SEQ ID NO: 76-83, в частности, V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 83;

2) домен VH, содержащий каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4, выбранные из подтипа каркаса VH, в частности, подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, подтипа VH3; где указанные каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4 имеют следующие замены (нумерация АНО): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144.

14. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из

SEQ ID NO: 7 и 10; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9 и 12;

или

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 20, 23, 26 и 28; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 22, 25, 27 и 29;

или

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 8 и 11; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9 и 12;

или

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичный любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 21 и 24; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 22 и 25.

15. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 7, 20 и 26; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9, 22 и 27;

или

1) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 8, 11 и 24; и

2) последовательность VL на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9, 12 и 25.

16. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-14, где указанные один или два ROR1-BD содержат

a) последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 7 и 10,

b) последовательность VL, выбранную из SEQ ID NO: 9 и 12;

или

a) последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 20, 23, 26 и 28,

b) последовательность VL, выбранную из SEQ ID NO: 22, 25, 27 и 29;

или

a) последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 8, 11 и 14,

b) последовательность VL, выбранную из SEQ ID NO: 9, 12 и 25.

17. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат

a) последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

b) последовательность VH SEQ ID NO: 10 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

c) последовательность VH SEQ ID NO: 20 и последовательность VL SEQ ID NO: 22;

или

d) последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;

или

e) последовательность VH SEQ ID NO: 8 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

f) последовательность VH SEQ ID NO: 11 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

g) последовательность VH SEQ ID NO: 21 и последовательность VL SEQ ID NO: 22;

или

h) последовательность VH SEQ ID NO: 24 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;

или

i) последовательность VH SEQ ID NO: 26 и последовательность VL SEQ ID NO: 27;

или

j) последовательность VH SEQ ID NO: 28 и последовательность VL SEQ ID NO: 29;

в частности, где указанные один или два ROR1-BD содержат

a) последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

b) последовательность VH SEQ ID NO: 10 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

c) последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;

или

d) последовательность VH SEQ ID NO: 8 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

е) последовательность VH SEQ ID NO: 11 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;
или

ф) последовательность VH SEQ ID NO: 24 и последовательность VL SEQ ID NO: 25.

18. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный CD3-BD связывается с CD3ε.

19. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный CD3-BD, если находится в формате scFv:

а) связывается с CD3ε человека с константой диссоциации (K_D) менее 50 нМ, в частности, с K_D от 0,1 до 50 нМ, в частности, от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR;

б) связывается с CD3 *Macaca fascicularis* (яванского макака) с K_D менее 50 нМ, в частности, с K_D от 0,1 до 50 нМ, в частности, от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR; и

с) имеет температуру плавления (T_m), определенную посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 60°C, в частности, по меньшей мере 65°C, более конкретно - по меньшей мере 67°C.

20. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный CD3-BD содержит каркасные последовательности домена VH1a, VH1b, VH3 или VH4 FR1-FR4; в частности, каркасные последовательности домена VH3 или VH4 FR1-FR4; в частности, каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4.

21. Мультиспецифическое антитело по пп.18-20, где указанный CD3-BD имеет один или оба из следующих признаков 1) и 2):

1) домен VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3, выбранные из подтипов V_κ, в частности, подтипов V_κ1 и V_κ3, в частности, принадлежащие подтипу V_κ1, и каркас FR4, выбранный из V_λ FR4, в частности, является V_λ FR4, содержащим аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности в отношении любой из SEQ ID NO: 76-83, более конкретно - V_λ FR4, выбранным из любой из SEQ ID NO: 76-83, в частности, V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 83;

2) домен VH, содержащий каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4, выбранные из подтипа каркаса VH, в частности, подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, принадлежащие подтипу VH3; где указанные каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4 имеют следующие замены (нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144.

22. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный CD3-BD содержит

а) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 36 или 37; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 38.

23. Мультиспецифическое антитело по п.22, где указанный CD3-BD содержит

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37, и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

24. Мультиспецифическое антитело по п.22 или 23, где указанная последовательность VH содержит аминокислотный остаток C51 (нумерация АНо), и указанная последовательность VL содержит аминокислотный остаток C141 (нумерация АНо).

25. Мультиспецифическое антитело по п.7, где указанный hSA-BD содержит

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно, и каркасные последовательности VH человека FR1, FR2, FR3 и FR4, выбранные из подтипа каркаса VH, в частности, подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, принадлежат подтип VH3; где указанные каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4, необязательно, имеют следующие замены (нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144; и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 42, 43 и 44, соответственно, и каркасные последовательности VL антитела человека FR1, FR2 и FR3, выбранные из подтипов Vk, в частности, подтипов Vk1 и Vk3, в частности, принадлежат подтипу Vk1, и каркасную последовательность VL антитела человека FR4, являющуюся последовательностью Vλ FR4, в частности, последовательностью Vλ FR4, выбранной из любых SEQ ID NO: 76-83, в частности последовательностью Vλ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 83;

или

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 49, 50 и 51, соответственно, и каркасные последовательности VH человека FR1, FR2, FR3 и FR4, выбранные из подтип каркаса VH, в частности, подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, принадлежат подтипу VH3; где указанные каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4, необязательно, имеют следующие замены(нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144; и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно, и каркасные последовательности VL антитела человека FR1, FR2 и FR3, выбранные из подтипов Vk, в частности, подтипов Vk1 и Vk3, в частности, принадлежат подтипу Vk1, и каркасную последовательность VL антитела человека FR4, являющуюся последовательностью Vλ FR4, в частности, последовательностью Vλ FR4, выбранной из любой из SEQ ID NO: 76-83, в частности, последовательностью Vλ FR4 в соответствии с

SEQ ID NO: 76 или 83;

или

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и каркасные последовательности VH человека FR1, FR2, FR3 и FR4, выбранные из подтипа каркаса VH, в частности, подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, принадлежат подтипу VH3, где указанные каркасные области VH FR1, FR2, FR3 и FR4, необязательно, имеют следующие замены(нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144; и

(ii) последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 62, 63 и 74, соответственно, и каркасные последовательности VL антитела человека FR1, FR2 и FR3, выбранные из подтипов V_κ, в частности, подтипов V_κ1 и V_κ3, в частности, принадлежат подтипу V_κ1, и каркасную последовательность VL антитела человека FR4, являющуюся последовательностью V_λ FR4, в частности, последовательностью V_λ FR4, выбранной из любой из SEQ ID NO: 76-83, в частности, последовательностью V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 83.

26. Мультиспецифическое антитело по пп.7 или 25, где указанный hSA-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(ii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(iii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или

(iv) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или

(v) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vi) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; или

(viii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

27. Мультиспецифическое антитело по пп.7-25, где указанный hSA-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(ii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или

(iii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; или

(iv) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

28. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные связывающие домены независимо выбраны из группы, состоящей из Fab, F(ab)₂, Fv, scFv, dsFv и scAb, в частности, из группы, состоящей из Fv, scFv и dsFv.

29. Мультиспецифическое антитело по п.28, где каждый из указанных связывающих доменов независимо выбран из

- a) когнатной пары домена VL и домена VH (Fv-фрагмент); или
- b) когнатной пары домена VL и домена VH, соединенных олиго- или полипептидным линкером (scFv-фрагмент).

30. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-29, где мультиспецифическое антитело содержит:

- a) один ROR1-BD;
- b) один CD3-BD; и
- c) один hSA-BD.

31. Мультиспецифическое антитело по п.30, где указанное мультиспецифическое антитело является одноцепочечным белком, где указанный одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность, состоящую из:

- (i) первого домена VL,
- (ii) первого полипептидного линкера,
- (iii) первого домена VH,
- (iv) второго полипептидного линкера,
- (v) второго домена VL,
- (vi) третьего полипептидного линкера, и
- (vii) второго домена VH,

расположенных друг за другом в указанном порядке,

где указанный первый домен VL связан с указанным вторым доменом VH с образованием первого связывающего домена, и указанный второй домен VL связан с указанным первым доменом VH с образованием второго связывающего домена,

и где указанный одноцепочечный белок дополнительно содержит

(viii) третий связывающий домен, образованный третьим доменом VL и третьим доменом VH, соединенными через четвертый полипептидный линкер, где указанный третий связывающий домен слит через C-конец или N-конец через пятый полипептидный линкер с указанной аминокислотной последовательностью,

где указанные три связывающие домена имеют следующие специфичности:

a) один связывающий домен специфически связывается с ROR1 человека (ROR1-BD);

b) другой связывающий домен специфически связывается с CD3 (CD3-BD); и

c) остающийся связывающий домен специфически связывается с hSA (hSA-BD).

32. Мультиспецифическое антитело по п.31, где три связывающих домена имеют

следующие специфичности:

а) один из первого и второго связывающих доменов специфически связывается с сывороточным альбумином человека (hSA-BD);

б) другой из первого и второго связывающих доменов специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD); и

с) третий связывающий домен специфически связывается с ROR1 (ROR1-BD);

в частности, три связывающих домена имеют следующие специфичности:

а) первый связывающий домен специфически связывается с сывороточным альбумином человека (hSA-BD);

б) второй связывающий домен специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD);

и

с) третий связывающий домен специфически связывается с ROR1 (ROR1-BD).

33. Мультиспецифическое антитело по п.30, где указанное мультиспецифическое антитело является гетеродимерным белком, содержащим первый и второй одноцепочечный белок,

где указанный первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ia) первого домена VL,

(iia) первого полипептидного линкера и

(iiia) второго домена VL, и

где указанный второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ib) первого домена VH,

(iib) второго полипептидного линкера и

(iiib) второго домена VH, и

где указанный первый домен VL ассоциирован с любым указанным первым или указанным вторым доменом VH с образованием первого связывающего домена, и указанный второй домен VL ассоциирован с другим из указанных доменов VH с образованием второго связывающего домена,

и где по меньшей мере один из указанного первого и указанного второго одноцепочечных белков дополнительно содержит

(iv) третий связывающий домен, образованный третьим доменом VL и третьим доменом VH, соединенным через третий полипептидный линкер, где указанный третий связывающий домен слит через четвертый полипептидный линкер с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью,

где указанные три связывающих домена имеют следующие специфичности:

а) один связывающий домен специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD);

б) другой связывающий домен специфически связывается с ROR1 (ROR1-BD); и

с) оставшийся связывающий домен специфически связывается с сывороточным альбумином человека (hSA-BD).

34. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.30-33, где указанное мультиспецифическое антитело:

a. связывается с внеклеточным доменом ROR1 человека с моновалентной константой диссоциации (K_D) менее 5 нМ, в частности, с моновалентной K_D от 1 пМ до 5 нМ, в частности, с K_D от 1 пМ до 1 нМ, в частности, от 1 до 500 пМ, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

b. связывается с CD3ε человека с (моновалентной) K_D менее 20 нМ, в частности, моновалентной K_D от 0,1 до 20 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR;

c. перекрестно реагирует с CD3ε *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связывается с CD3ε яванского макака с моновалентной K_D 30 нМ или менее, в частности, с моновалентной K_D от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 20 нМ, что измеряют посредством SPR;

d. связывается с экспрессирующими ROR1 человека клетками MDA-MB-231 с EC_{50} от 0,01 до 50 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 30 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 20 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 10 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 5 нМ;

e. имеет EC_{50} для уничтожения экспрессирующих ROR1 человека клеток-мишеней MDA-MB-231 менее 5 нМ, в частности, от 1 пМ до 5 нМ, в частности, от 1 пМ до 2 нМ, в частности, от 1 пМ до 1 нМ, что определяют в анализе направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных клеток-мишеней;

f. имеет температуру плавления (T_m), определяемую посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 55°C, предпочтительно - по меньшей мере 58°C, более предпочтительно - по меньшей мере 60°C, в частности, где указанный антигенсвязывающий фрагмент находится в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ D(+)-сахарозой при pH 6,5;

g. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 1%, например, менее 0,5%, менее 0,3%, менее 0,2%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 1 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ D(+)-сахароза при pH 6,5; и/или

h. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 40°C менее 5%, например, менее 4%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 1 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ D(+)-сахароза при pH 6,5.

35. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.30, 31, 33 и 34, где указанное мультиспецифическое антитело выбрано из антитела, определенного по SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 107 и 108.

36. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-29, где мультиспецифическое антитело содержит:

a) два ROR1-BD;

b) один CD3-BD; и

с) один hSA-BD.

37. Мультиспецифическое антитело по п.36, где два ROR1-BD связываются с одним и тем же эпитопом на внеклеточном домене ROR1 или разными эпитопами на внеклеточном домене ROR1, конкретно - с одним и тем же эпитопом на внеклеточном домене ROR1.

38. Мультиспецифическое антитело по пп.36 или 37, где указанное мультиспецифическое антитело является гетеродимерным белком, содержащим первый и второй одноцепочечный белок,

где указанный первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к C-концу):

(ia) первого домена VL,

(iia) первого полипептидного линкера и

(iiia) второго домена VL, и

где указанный второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к C-концу):

(ib) первого домена VH,

(iib) второго полипептидного линкера и

(iiib) второго домена VH, и

где указанный первый домен VL связан с указанным первым или указанным вторым доменом VH с образованием первого связывающего домена, и указанный второй домен VL связан с другим из указанных доменов VH с образованием второго связывающего домена,

и где по меньшей мере один из указанных первого и указанного второго одноцепочечных белков дополнительно содержит

(iv) третий связывающий домен, образованный третьим доменом VL и третьим доменом VH, соединенными через третий полипептидный линкер, где указанный третий связывающий домен слит через четвертый полипептидный линкер с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью,

и где по меньшей мере один из указанного первого и указанного второго одноцепочечных белков дополнительно содержит

(v) четвертый связывающий домен, образованный четвертым доменом VL и четвертым доменом VH, соединенными через пятый полипептидный линкер, где указанный четвертый связывающий домен слит через шестой полипептидный линкер с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью,

где четыре связывающих домена имеют следующие специфичности:

а) один связывающий домен специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD);

б) другие два связывающих домена специфически связываются с ROR1 (ROR1-BD);

и

с) оставшийся связывающий домен специфически связывается с сывороточным альбумином человека (hSA-BD).

39. Мультиспецифическое антитело по п.38, где третий связывающий домен слит с первой или второй аминокислотной последовательностью, и четвертый связывающий

домен слит с другой из двух указанных аминокислотных последовательностей.

40. Мультиспецифическое антитело по п.38 или 39, где четыре связывающих домена имеют следующие специфичности:

а) первый связывающий домен специфически связывается с CD3 человека (CD3-BD);

б) второй связывающий домен специфически связывается с сывороточным альбумином человека (hSA-BD); и

с) третий и четвертый связывающие домены специфически связываются с ROR1 (ROR1-BD).

41. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.36-40, где указанное мультиспецифическое антитело:

а. связывается с внеклеточным доменом ROR1 человека с моновалентной константой диссоциации (K_D) менее 10 нМ, в частности, с моновалентной K_D от 10 пМ до 5 нМ, в частности, с K_D от 10 пМ до 7 нМ, в частности, от 10 пМ до 5 нМ, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

б. связывается с CD3ε человека с моновалентной K_D менее 20 нМ, в частности, с моновалентной K_D от 0,1 до 20 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR;

с. перекрестно реагирует с CD3ε *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связывается с CD3ε яванского макака с моновалентной K_D 30 нМ или менее, в частности, с моновалентной K_D от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 20 нМ, что измеряют посредством SPR;

д. связывается с экспрессирующими ROR1 человека клетками MDA-MB-231 с EC_{50} от 0,01 до 10 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 10 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 5 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 3 нМ, в частности, с EC_{50} от 0,01 до 2 нМ;

е. имеет EC_{50} для уничтожения экспрессирующих ROR1 человека клеток-мишеней MDA-MB-231 менее 500 пМ, в частности, от 0,1 пМ до 500 пМ, в частности, от 0,1 пМ до 200 пМ, в частности, от 0,1 до 100 пМ, в частности, от 0,1 до 50 пМ, что определяют в анализе направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных клеток-мишеней;

ф. имеет EC_{50} для уничтожения экспрессирующих ROR1 человека клеток-мишеней JEKO-1 менее 20 пМ, в частности, от 0,01 пМ до 20 пМ, в частности, от 0,01 пМ до 10 пМ, в частности, от 0,01 до 5 пМ, в частности, от 0,01 до 3 пМ, что определяют в анализе направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных клеток-мишеней;

г. имеет EC_{50} для уничтожения экспрессирующих ROR1 человека клеток-мишеней SKOV-3 менее 1000 пМ, в частности, от 0,1 пМ до 1000 пМ, в частности, от 0,1 пМ до 500 пМ, в частности, от 0,1 до 200 пМ, в частности, от 0,1 до 100 пМ, что определяют в анализе направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных клеток-мишеней;

h. имеет температуру плавления (T_m), определяемую посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 53°C, предпочтительно - по меньшей мере, 55°C, более предпочтительно - по меньшей мере 58°C, в частности, где

указанный антигенсвязывающий фрагмент составляют в 50 мМ фосфатно-цитратного буфера с 300 мМ сахарозой при pH 6,5;

i. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение двух недель при 4°C менее 1%, в частности, менее 0,5%, если указанное мультиспецифическое антитело находится в начальной концентрации 1 мг/мл, и в частности, где указанное мультиспецифическое антитело составляют в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ D(+)-сахарозой при pH 6,5; и/или

j. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение по меньшей мере четырех недель при 40°C менее 5%, если указанное мультиспецифическое антитело находится в начальной концентрации 1 мг/мл, и в частности, где указанное мультиспецифическое антитело составляют в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ D(+)-сахарозой при pH 6,5.

42. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.36-41, где

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 102; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 106; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114; или

указанный первый одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115, и

указанный второй одноцепочечный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, более конкретно - состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116.

43. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.32 и 38-41, где указанный гетеродимерный белок не содержит когнатную пару из первого и второго белковых взаимодействующих доменов, иных, чем указанный первый и второй домены VL и VH, где указанный первый белковый взаимодействующий домен содержится в указанном первом одноцепочечном белке, и где указанный второй белковый взаимодействующий домен содержится в указанном втором одноцепочечном белке.

44. Мультиспецифическое антитело по п.43, где указанный первый одноцепочечный

белок и указанный второй одноцепочечный белок гетеродимеризуются в параллельной ориентации, то есть указанный первый домен VL связан с указанным первым доменом VH, и указанный второй домен VL связан с указанным вторым доменом VH.

45. Мультиспецифическое антитело по п.43, где указанный первый одноцепочечный белок и указанный второй одноцепочечный белок гетеродимеризуются в антипараллельной ориентации, то есть указанный первый домен VL связан с указанным вторым доменом VH, и указанный второй домен VL связан с указанным первым доменом VH.

46. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.30-45, где любые связывающие домены, содержащиеся в указанном одноцепочечном белке или гетеродимерном белке, являются переменными доменами иммуноглобулина, расположенными в указанном первом и втором одноцепочечном белке и, как правило, соединенными через линкеры.

47. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере один из указанных переменных доменов антитела содержит области CDR, полученные из родительского антитела кролика.

48. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где ROR1-BD или, в случае наличия двух ROR1-BD в мультиспецифическом антителе, по меньшей мере один из ROR1-BD и CD3-BD могут связываться со своими соответствующими антигенами одновременно, или, в случае наличия двух ROR1-BD в мультиспецифическом антителе, оба ROR1-BD и CD3-BD могут связываться со своими соответствующими антигенами одновременно.

49. ROR1-BD по любому из пп.1, 4 и 11-17.

50. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) один или два ROR1-BD по п.49;

б) по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающийся с иной мишенью, чем ROR1.

51. Нуклеиновая кислота или две нуклеиновые кислоты, кодирующие мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 и 50 или ROR1-BD по п.49.

52. Вектор или два вектора, содержащие нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по п.51.

53. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по п.52.

54. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пп.1-48 и 50 или ROR1-BD по п.49, включающий (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот по п.51 или вектора или двух векторов по п.52, экспрессию указанной нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот или указанного вектора или векторов и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного ROR1-BD из системы экспрессии, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по п.53, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного ROR1-BD из культуры клеток.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 и 50 и фармацевтически приемлемый носитель.

56. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 и 50 для применения в качестве лекарственного средства.

57. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 и 50 для применения в лечении заболевания, в частности, заболевания человека, более конкретно - заболевания человека, выбранного из злокачественных новообразований.

58. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 и 50 для применения в лечении заболевания по п.57, где указанное заболевание является ROR1-экспрессирующим злокачественным новообразованием.

59. Мультиспецифическое антитело по п.58, где указанное ROR1-экспрессирующее злокачественное новообразование выбрано из хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (CLL/SLL), острого миелолейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), волосатоклеточного лейкоза, фолликулярной лимфомы (FL), лимфомы из клеток маргинальной зоны (MZL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), неходжкинской лимфомы (NHL), синдрома Рихтера (RS), рака легких, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака яичника, глиобластомы, рака яичка, рака матки, рака надпочечника, меланомы, нейробластомы, саркомы и рака почки.

60. Способ лечения заболевания, в частности, заболевания человека, более конкретно - заболевания человека, выбранного из злокачественных новообразований, включающий стадию введения мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-48 нуждающемуся в этом пациенту.

61. Способ по п.60, где указанное заболевание является ROR1-экспрессирующим злокачественным новообразованием.

62. Способ по п.61, где указанное ROR1-экспрессирующее злокачественное новообразование выбрано из хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (CLL/SLL), острого миелолейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), волосатоклеточного лейкоза, фолликулярной лимфомы (FL), лимфомы из клеток маргинальной зоны (MZL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), неходжкинской лимфомы (NHL), синдрома Рихтера (RS), рака легких, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака яичника, глиобластомы, рака яичка, рака матки, рака надпочечников, меланомы, нейробластомы, саркомы и рака почки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0027] На фиг. 1 показаны типичные кривые концентрация-ответ scFv против ROR1 PRO2060 (A, B) и PRO2062 в отношении ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках MDA-MB-231, и ROR1-отрицательных клеток MCF-7 по результатам проточной цитометрии. PRO2060 и PRO2062 демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231 (A, C), в то время как не наблюдали связывания с ROR1-

отрицательными клетками MCF-7 (B, D). По сравнению с референсным Fab-фрагментом PRO2213, PRO2060 демонстрировал в приблизительно три раза более низкую EC₅₀ связывания, и PRO2062 демонстрировал в приблизительно три раза более высокую EC₅₀ связывания. Точки данных на фигуре соответствуют среднему для двух технических параллелей.

[0028] На фиг. 2 показаны кривые концентрация-ответ оптимизированных scFv против ROR1 PRO2271 (A, B), а также PRO2291 и PRO2292 (C, D) в отношении ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках MDA-MB-231, и ROR1-отрицательных клеток MCF-7 по результатам проточной цитометрии. Все scFv демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231 (A, C), в то время как не обнаруживали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (B, D). По сравнению с PRO2062, оптимизированный PRO2271 демонстрировал в приблизительно два раза более низкую EC₅₀ связывания. Варианты PRO2060 и PRO2062, включающие междоменную V_L-V_H дисульфидную связь для стабилизации, PRO2291 и PRO2292, демонстрировали схожую EC₅₀ связывания при сравнении с PRO2060 и PRO2062. Точки данных на фигуре соответствуют среднему для двух технических параллелей.

[0029] На фиг. 3 показана схема триспецифического формата scMATCH3.

[0030] На фиг. 4 показаны кривые концентрация-ответ молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 PRO2286, PRO2287 (A, B) и PRO2257 (C, D) в отношении ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках MDA-MB-231, и ROR1-отрицательных клеток MCF-7 по результатам проточной цитометрии. Все три молекулы scMATCH3 демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231 (A, C) в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (B, D). PRO2213 включали в качестве референсного антитела против ROR1. Точки данных на фигуре соответствуют среднему для двух технических параллелей.

[0031] На фиг. 5 показаны кривые концентрация-ответ молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 PRO2507, PRO2508, PRO2509, PRO2510 и PRO2668 в отношении ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках MDA-MB-231, и ROR1-отрицательных клеток MCF-7 по результатам проточной цитометрии. Все молекулы scMATCH3 демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231 (A, B, C), в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (D). Оптимизированный вариант PRO2510, PRO2668, демонстрировал связывание с клетками MDA-MB-231 (E), в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (F). PRO2213 включали в качестве референсного антитела против ROR1. Точки данных на фигуре соответствуют среднему для двух технических параллелей.

[0032] На фиг. 6 показана экспрессия ROR1 и количественный анализ участков связывания клеток MDA-MB-231 и MCF7. (A) Уровни экспрессии ROR1 определяли посредством окрашивания антителом ROR1 указанных опухолевых клеток с последующей проточной цитометрией. На синих гистограммах показана экспрессия ROR1, в то время как контроль указан красным. (B) Поверхностные уровни ROR1 количественно анализировали

с использованием набора Quantum Simply Cellular anti-mouse IgG kit. Числами указано количество участков связывания, вычисленное на поверхности клеток.

[0033] На фиг. 7 показана цитотоксичность и активация CD8 Т-клеток, опосредованная ROR1-направленными молекулами scMATCH3. (А) РВМС сокультивировали с клетками MDA-MB-231 (вверху) или клетками MCF7 (внизу) при соотношении эффектор-мишень 10:1 в течение 40 часов. Контроли включают клетки-мишени в отдельности (спонтанный лизис), а также клетки-мишени, обработанные 1% Triton в начале эксперимента или в конце эксперимента. (В) активация CD8 Т-клеток и (С) активация CD4 Т-клеток, указанные по доле CD69⁺ клеток, из набора данных, показанного на (А). Показан один типичный эксперимент из трех.

[0034] На фиг. 8 показана цитотоксичность и активация CD8 Т-клеток, опосредованная ROR1-направленными молекулами scMATCH3. (А) РВМС сокультивировали с клетками MDA-MB-231 (вверху) или клетками MCF7 (внизу) при соотношении эффектор-мишень 10:1 в течение 40 часов. Контроли включают клетки-мишени в отдельности (спонтанный лизис), а также клетки-мишени, обработанные 1% Triton в начале эксперимента или в конце эксперимента. (В) активация CD8 Т-клеток и (С) активация CD4 Т-клеток, указанные по доле CD69⁺ клеток, из набора данных, показанного на (А). Показан один эксперимент из двух.

[0035] На фиг. 9 показана схема формата MATCH4.

[0036] На фиг. 10 показаны кривые концентрация-ответ бивалентных молекул против ROR1 MATCH4 PRO2589, PRO2590, PRO2591 и PRO2592 в отношении ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках MDA-MB-231 (А, В), ROR1 человека, экспрессирующегося на клетках JMT-1 (С, D), и ROR1-отрицательных клеток MCF-7 (Е) по результатам проточной цитометрии. Все молекулы MATCH4 демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231 (А, В) и ROR1-положительными клетками JMT-1 (С, D), в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (Е). Оптимизированный вариант PRO2590, PRO2670, демонстрировал связывание с клетками MDA-MB-231 (F) в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (G). Fab-фрагмент PRO2213 включали в качестве референсного антитела против ROR1. Точки данных на фигуре соответствуют среднему для двух технических параллелей.

[0037] На фиг. 11 показаны уровни поверхностной экспрессии ROR1, определенные посредством окрашивания антителом ROR1 указанных опухолевых клеток с последующей проточной цитометрией. На синих гистограммах показана экспрессия ROR1, в то время как отрицательный контроль указан красным.

[0038] На фиг. 12 показана цитотоксичность, опосредованная интересующими молекулами scMATCH3 и MATCH4 в нескольких ROR1-экспрессирующих линиях клеток. Пан-Т-клетки сокультивировали с клетками MDA-MB-231 (А, вверху слева), JMT-1 (А, внизу слева), SKOV-3 (А, вверху справа) или клетками Jeko-1 (А, вверху справа) при соотношении эффектор-мишень 10:1 в течение 40 часов. Контроли включают клетки-

мишени в отдельности (спонтанный лизис), а также клетки-мишени, обработанные 1% Triton в начале эксперимента или в конце эксперимента. Молекулы MATCH4 представляют собой PRO2589, PRO2590, PRO2591 и PRO2592, и кривые обозначены цветом в зависимости от домена; молекулы scMATCH3 представляют собой PRO2507, PRO2510 и PRO2557. Показан один эксперимент из четырех. MCF7 использовали в качестве референсных клеток (B), то есть ROR1-отрицательные клетки, и обрабатывали, как описано для A. Планки погрешностей соответствуют колебаниям между техническими параллелями.

[0039] На фиг. 13 показана активация Т-клеток, опосредованная интересующими молекулами MATCH в нескольких ROR1-экспрессирующих линиях клеток. Пан-Т-клетки сокультивировали с клетками MDA-MB-231(A), JIMT-1 (B) или клетками SKOV-3 (C) при соотношении эффектор-мишень 10:1 в течение 40 часов. Супернатанты анализировали на высвобождение ЛДГ и клетки анализировали посредством проточной цитометрии на наличие активированных Т-клеток, о чем свидетельствует доля CD69-экспрессирующих клеток. Верхние графики соответствуют CD8 Т-клеткам, в то время как нижние соответствуют CD4 Т-клеткам. Молекулы MATCH4 представляют собой PRO2589, PRO2590, PRO2591 и PRO2592, и кривые обозначены цветом в зависимости от домена; молекулы scMATCH3 представляют собой PRO2507, PRO2510 и PRO2557. Показан один эксперимент из 3 (SKOV-3) или 4 (MDA-MB-231, JIMT-1). Планки погрешностей соответствуют колебаниям между техническими параллелями.

[0040] На фиг. 14 показаны уровни абсорбции уже существующих ADA в 21 образцах сыворотки человека для PRO2668 (A), PRO2669 (B), PRO2510 (C) и PRO2589 (D), определенные с помощью анализа связывания уже существующих ADA на основе ELISA, описанного в примере 10. Измерения осуществляли с дополненными и недодолженными образцами сыворотки (условия подтверждающего анализа). Дополнительно показано соответствующее снижение уровней абсорбции (ингибирование (%)) дополненных образцов сыворотки человека для указанных молекул (E).

[0041] На фиг. 15 показана цитотоксичность и активация CD8 Т-клеток, опосредованная ROR1-нацеленными молекулами scMATCH3 и scMATCH4. Пан-Т-клетки сокультивировали с клетками MDA-MB-231 (A, вверху) или клетками JIMT-1 (A, внизу) при соотношении эффектор-мишень 10:1 в течение 40 часов. Контроли включают клетки-мишени в отдельности (спонтанный лизис), а также клетки-мишени, обработанные 1% Triton в начале эксперимента или в конце эксперимента. Активация CD8 Т-клетка, о которой свидетельствует доля CD8⁺CD69⁺ клеток (B), из набора данных, показанного на A. Показан один типичный эксперимент из по меньшей мере двух независимых экспериментов.

[0042] На фиг. 16 показана опосредованная PRO2668 цитотоксичность посредством опосредованного Т-клетками истощения примеров линий клеток солидных опухолей (A). График, на котором показаны значения EC₅₀ для разных линий клеток солидных опухолей в зависимости от плотности рецептора ROR1 (B). Цитотоксичность посредством

опосредованного Т-клетками истощения линий клеток гемобластозов (С). Линии опухолевых клеток сокультивировали вместе с Т-клетками в течение 40 ч. и оценивали цитотоксичность с использованием высвобождения лактатдегидрогеназы относительно контролей. Среднее количество рецепторов ROR1 на поверхности клетки, а также средние значения EC₅₀ цитотоксичности показаны на вставках к графику.

[0043] На фиг. 17 показана PRO2668-опосредованная активация и пролиферация CD8 Т-клеток в день 6 с использованием MDA-MB-231 или JIMT-1 в качестве целевых клеток солидных опухолей (А). Активация и пролиферация CD8 Т-клеток в день 3, опосредованная Z-138, в качестве целевых клеток гемобластозов (В). Клетки-мишени и здоровые, меченые фиолетовым CellTrace Т-клетки сокультивировали при соотношении Е:Т 5:1. Долю пролиферирующих клеток определяли посредством разведения фиолетового CellTrace относительно контролей. Активированные клетки идентифицировали посредством мечения CD25. Показан один типичный эксперимент из двух.

[0044] На фиг. 18 показана гистограмма клеток CLL и активно делящихся клеток Jeko-1 (А). Образцы клеток CLL не пролиферируют. Оценивали встраивание 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) на активно делящейся линии опухолевых клеток Jeko-1 (темно-серая гистограмма) по сравнению с PBMC пациента с CLL (светло-серая гистограмма). Встраивание EdU свидетельствует о делении клеток. Поверхностная экспрессия ROR1 и количественный анализ показаны для PBMC пациента с CLL (белая гистограмма, относительно отрицательного контроля, показанного черным) (В). Связывание PRO2668, гейтированное по опухолевым клеткам пациента с CLL (С). PBMC пациента с CLL сокультивировали с аллогенными здоровыми Т-клетками при соотношении Е:Т 5:1 в течение 40 ч. Специфическое уничтожение (D) определяли по доле положительных по аннексину V и красителю Live/Dead клеток CLL после обработки. Т-клетки из D окрашивали на маркер активации CD69 (Е). Супернатанты из D оценивали на высвобождение цитокинов с использованием цитометрической мультиплексной системы на микрочастицах (F). Показанные данные соответствуют одному из четырех независимых доноров/экспериментов.

[0045] На фиг. 19 показано лонгитудинальное ингибирование роста опухоли (медиана) в присутствии разных доз молекул scMATCH3 PRO2668 и scMATCH4 PRO2670. Иммунокомпрометированным мышам подкожно имплантировали клетки Jeko-1 с последующим приживлением PBMC через 3 дня. После достижения объемов опухолей 80-100 мм³ животных рандомизировали и начинали введение доз. Введение осуществляли каждые пять дней. Лонгитудинальные данные анализировали с использованием модели со смешанными эффектами, а затем критерия множественных сравнений Тьюки. ns: незначимо; **p≤0,01; * p≤0,05; относительно контрольного IgG (паливизумаб) в конце эксперимента.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0046] Широкий спектр гемобластозов и солидных злокачественных новообразований экспрессирует ROR1, что делает ROR1-экспрессирующие

злокачественные новообразования привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Однако существующие биспецифические терапевтические антитела против ROR1×CD3, разработанные к настоящему времени, как правило, не имеют ожидаемой широты эффективности против этих типов злокачественных новообразований. В частности, эти терапевтические биспецифические антитела против ROR1×CD3 зачастую имеют умеренную активность против злокачественных клеток, экспрессирующих низкие уровни ROR1. Кроме того, эти известные на предшествующем уровне техники антитела, как правило, демонстрируют низкий процент максимального уничтожения - зачастую гораздо ниже 50% - в анализах цитотоксичности против многих ROR1-экспрессирующих злокачественных клеток, что свидетельствует о том, что их механизм действия не является идеальным. Таким образом, в медицине существует потребность в улучшенных терапевтических средствах на основе антител против ROR1×CD3, имеющие более высокую эффективность для воздействия на широкий диапазон ROR1-экспрессирующих злокачественных новообразований, включая злокачественные новообразования, экспрессирующие ROR1 на уровнях от умеренных до низких.

[0047] Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антителам, содержащим один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD), и один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD), где области CDR ROR1-BD и CD3-BD имеют приведенные выше определения. Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению могут эффективно уничтожать злокачественные клетки, экспрессирующие высокие уровни ROR1, а также злокачественные клетки, экспрессирующие ROR1 только на низких уровнях. Некоторые из мультиспецифических антител по настоящему изобретению, например, PRO2589 и PRO2591, демонстрируют субпикомолярную EC_{50} для уничтожения клеток JEKO-1 с высокой экспрессией ROR1, и некоторые из этих мультиспецифических антител, например, PRO2589 и PRO2590, демонстрируют EC_{50} для уничтожения клеток рака яичника SKOV-3 с низкой экспрессией ROR1 ниже 50 пМ, что определяют в анализах в направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных клеток-мишеней (например, фиг. 12 и 15).

[0048] Кроме того, мультиспецифические антитела по изобретению, содержащие один ROR1-BD, как определено в настоящем описании, демонстрируют максимальное уничтожение разных ROR1-экспрессирующих злокачественных клеток 70% и выше, что определяют в анализах в направляемой Т-клетками цитотоксичности против указанных злокачественных клеток. Например, PRO2510 демонстрирует максимальное уничтожение приблизительно 80% для злокачественных клеток MDA-MB-231, злокачественных клеток JEKO-1, злокачественных клеток JIMT-1 и злокачественных клеток SKOV-3, экспрессирующих уровни ROR1 от высоких до низких (например, фиг. 12 и 15).

[0049] Кроме того, мультиспецифические антитела против ROR1×CD3 по настоящему изобретению демонстрируют очень благоприятные биофизические свойства, в частности, исключительную стабильность при хранении.

[0050] Таким образом, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению обеспечивают другие терапевтические преимущества относительно общепринятой терапии.

[0051] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринято понятным специалистам в области, к которой относится изобретение.

[0052] Термины "содержащий" и "включающий" используют в настоящем описании в открытом и неограничивающем смысле, если не указано иначе. В контексте таких вариантов осуществления термин "содержащий", таким образом, включает более узкий термин "состоящий из".

[0053] Термины в единственном числе в контексте описания изобретения (особенно в отношении следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающие единственное и множественное число, если в настоящем описании не указано иначе, или это четко не противоречит контексту. Например, термин "клетка" включает множество клеток, включая их смеси. Если форму во множественном числе используют для соединений, солей и т.п., это также должно означать одно соединение, соль или т.п.

[0054] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

- a) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и
- b) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);
где указанные ROR1-BD и указанный CD3-BD содержат последовательности CDR, как определено выше.

[0055] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

- a) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и
- b) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);
где указанные ROR1-BD и указанный CD3-BD содержат последовательности CDR, как определено выше; и где мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина.

[0056] В рамках изобретения термин "антитело" и т.п. включает целые антитела или их отдельные цепи; и любой антигенсвязывающий фрагмент (то есть "антигенсвязывающая часть") или его отдельные цепи; и молекулы, содержащие CDR, области VH или области VL антител (включая, в качестве неограничивающих примеров, мультиспецифические антитела). Природное "целое антитело" является гликопротеином, содержащим по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и

СНЗ. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), фланкированные областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[0057] В рамках изобретения термин "Fc-область иммуноглобулина" или "Fc-область" используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, то есть домены СН2 и СН3 константных областей тяжелой цепи. Термин "Fc-область" включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области, то есть Fc-области, сконструированные для достижения некоторых желаемых свойств, таких как, например, измененная функция связывания Fc-рецептора, и/или снижения или супрессии замены Fab-плеча. Примером такой сконструированной Fc-области является технология "выступ во впадину" (KiH) (см., например, Ridgway *et al.*, Protein Eng. 9:617-21 (1996) и Spiess *et al.*, J Biol Chem. 288(37):26583-93 (2013)). Fc-области с нативной последовательностью включают IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4 человека. "Fc-рецептор" или "FcR" означает рецептор, связывающийся с Fc-областью антитела. В частности, FcR является FcR человека с нативной последовательностью, связывающимся с антителом IgG, (гамма-рецептором) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы FcγRII, включая FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRI IB ("ингибирующий рецептор"), имеющие схожие аминокислотные последовательности, отличающиеся, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 5:203-234 (1997)). Обзор FcR в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capet *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); и de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин "FcR" в настоящем описании. Термин "Fc-рецептор" или "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG в плод. Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) и Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994). Известны способы измерения связывания с FcRn (см.,

например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* TJI (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al). Связывание с FcRn *in vivo* и время полужизни высокоаффинных, связывающих FcRn человека полипептидов в сыворотке можно анализировать, например, на трансгенных мышах или трансфицированных линиях клеток человека, экспрессирующих FcRn человека, или на приматах, которым вводят полипептиды, имеющие вариант Fc-области. В WO 2004/42072 (Presta) описывают варианты антител, имеющих улучшенное или сниженное связывание с FcR. Также см., например, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

[0058] В рамках изобретения термины "связывающий домен", "его антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть" антитела и т.п. относятся к одному или более фрагментам интактного антитела, сохраняющим способность специфически связываться с указанным антигеном (например, ROR1, CD3, hSA). Антигенсвязывающие функции антитела могут выполняться фрагментами интактного антитела. В частности, в случае мультиспецифических антител по настоящему изобретению в рамках изобретения термины "связывающий домен", "его антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть" и т.п. относятся к Fab-фрагменту, то есть моновалентному фрагменту, состоящему из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)₂-фрагменту, то есть бивалентному фрагменту, содержащему два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fv-фрагменту, состоящему из доменов VL и VH одного плеча антитела; стабилизированному дисульфидными связями Fv-фрагменту (dsFv); одноцепочечному Fv-фрагменту (scFv) и scAb, то есть отдельной цепи, состоящей из доменов VL, VH и CL одного плеча антитела. Предпочтительно, связывающие домены антител по настоящему изобретению независимо друг от друга выбраны из Fv-фрагмента, scFv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В конкретных вариантах осуществления связывающие домены антител по настоящему изобретению независимо друг от друга выбраны из одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В других конкретных вариантах осуществления домены VL и VH scFv-фрагмента стабилизированы междоменной дисульфидной связью, в частности, указанная последовательность VH содержит один остаток цистеина в положении 51 (нумерация АНо), и указанная последовательность VL содержит один остаток цистеина в положении 141 (нумерация АНо).

[0059] В одном из вариантов осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению не содержит области CH1 и/или CL. В конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению не содержит ни Fc-области иммуноглобулина, ни области CH1 и CL.

[0060] Термин "определяющие комплементарность области" ("CDR") относится к аминокислотным последовательностям с границами, определенными с использованием любых из ряда хорошо известных схем, включая описанные Kabat *et al.* (1991), "Sequence of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of

Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273, 927-948 (схема нумерации "Chothia"); схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)) (схему нумерации "IMGT"); и схему нумерации, описанную в Honegger & Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 657-670 (схему нумерации "АНо"). Например, для классических форматов по Kabat аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы как 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). По Chothia аминокислоты CDR в VH пронумерованы как 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). При комбинировании определений CDR по Kabat и Chothia CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. По IMGT аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы как приблизительно 26-35 (HCDR1), 51-57 (HCDR2) и 93-102 (HCDR3) и аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы как приблизительно 27-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) (нумерация по "Kabat"). По IMGT CDR антитела можно определять с использованием программного обеспечения IMGT/DomainGap Align.

[0061] В контексте настоящего изобретения используют систему нумерации, предложенную Honegger & Plückthun ("АНо") (Honegger & Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 657-670), если конкретно не указано иное. В частности, следующие остатки определены как CDR по схеме нумерации АНо: LCDR1 (также обозначаемый как CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (также обозначаемый как CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (также обозначаемый как CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (также обозначаемый как CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (также обозначаемый как CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (также обозначаемый как CDR-H3): H108-H138. Для краткости, в системе нумерации по Honegger & Plückthun учитывают разнообразие длины, обнаруживаемое в природных антителах в разных подсемействах VH и VL и, в частности, в CDR, и пропуски в последовательностях. Таким образом, в указанном вариабельном домене антитела, как правило, не все положения от 1 до 149 будут заняты аминокислотным остатком.

[0062] В рамках изобретения термин "специфичность связывания" относится к способности отдельного антитела реагировать с одной антигенной детерминантой, но не с другой антигенной детерминантой. В рамках изобретения термин "специфически связывается с" или "является специфическим для" относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, свидетельствующим о наличии мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, специфически связывающееся с мишенью (которая может являться эпитопом), является антителом, связывающимся со своей мишенью с более высокой аффинностью, авидностью, легче и/или с большей

длительностью, чем с другими мишенями. В наиболее общей форме (и когда отсутствует определенная ссылка) термин "специфическое связывание" относится к способности антитела различать интересующую мишень и неродственную молекулу, что определяют, например, в анализе специфичности известными в этой области способами. Такие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, анализы вестерн-блоттинга, ELISA, RIA, ECL, IRMA, SPR (поверхностный плазмонный резонанс) и пептидное сканирование. Например, можно осуществлять стандартный анализ ELISA. Балльную оценку можно осуществлять с помощью стандартного проявления цвета (например, вторичного антитела с пероксидазой хрена и тетраметилбензидина с пероксидом водорода). Реакцию в некоторых лунках оценивают по оптической плотности, например, при 450 нм. Типичный фон (= отрицательная реакция) может составлять приблизительно 0,1 OD; типичная положительная реакция может составлять приблизительно 1 OD. Это означает, что соотношение между положительной и отрицательной оценкой может составлять 10 раз или более. В дополнительном примере можно осуществлять анализ SPR, где по меньшей мере 10-кратное, в частности, по меньшей мере 100-кратное различие между фоном и сигналом свидетельствует о специфическом связывании. Как правило, определение специфичности связывания осуществляют с использованием не одной референсной молекулы, а набора из приблизительно от трех до пяти неродственных молекул, таких как порошковое молоко, трансферрин или т.п.

[0063] Соответственно, антитела по изобретению являются выделенными антителами. В рамках изобретения термин "выделенное антитело" относится к антителу, по существу, не содержащему другие антитела, имеющие другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с ROR1 и CD3, по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем ROR1 и CD3, или выделенное антитело, специфически связывающееся с ROR1, CD3 и hSA, по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем ROR1, CD3 и hSA). Кроме того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

[0064] Соответственно, антитела по изобретению являются моноклональными антителами. В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" относится к антителам, имеющим, по существу, идентичные аминокислотные последовательности или полученным из одного генетического источника. Моноклональное антитело демонстрирует специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или специфичность связывания и аффинности к конкретным эпитопам.

[0065] Антитела по изобретению включают, в качестве неограничивающих примеров, химерные, человеческие и гуманизированные антитела.

[0066] В рамках изобретения термин "химерное антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) относится к молекуле антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента), в которой (а) константная область или ее часть изменена, замещена или заменена таким образом, что антигенсвязывающий участок

(вариабельная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или биологического вида; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, замещена или заменена вариабельной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность. Например, антитело мыши можно модифицировать посредством замены его константной области константной областью иммуноглобулина человека. Из-за замены константной областью человека, химерное антитело может сохранять свою специфичность при распознавании антигена, в то же время обладая сниженной антигенностью для человека по сравнению с исходным антителом мыши.

[0067] В рамках изобретения термин "антитело человека" (или его антигенсвязывающий фрагмент) предназначен для включения антител (и их антигенсвязывающих фрагментов), имеющих вариабельные области, в которых каркасные области и области CDR получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей зародышевой линии человека или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека. Антитела человека и их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями человека (например, мутации, встраиваемые в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматического мутагенеза *in vivo*). Это определение антитела человека конкретно исключает гуманизованное антитело, содержащее непринадлежащие человеку антигенсвязывающие остатки. Антитела человека можно получать различными способами, известными в этой области, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1992); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Для получения моноклональных антител человека также доступны способы, описанные в Cole *et al.*, *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voemer *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Также см. van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получать посредством введения антигена трансгенному животному, модифицированному для получения таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которых заблокированы, например, иммунизированным ксеномышам (см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, касающиеся технологии XENOMOUSE™). Также см., например, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006), касающуюся антител человека, полученных с помощью технологии гибридом В-клеток человека.

[0068] В рамках изобретения термин "гуманизованное" антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) относится к антителу (или его антигенсвязывающему фрагменту), сохраняющему реакционную способность непринадлежащего человеку антитела, в то же время являясь менее иммуногенным для людей. Этого можно достигать, например, сохраняя непринадлежащий человеку области CDR и заменяя остальные части антитела соответствующими компонентами человека (то есть константную область, а также

каркасные части переменной области). Можно осуществлять дополнительные модификации каркасной области в каркасных последовательностях человека, а также в последовательностях CDR, полученных из зародышевой линии другого вида млекопитающих. Гуманизированные антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, встраиваемые в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматического мутагенеза *in vivo*, или консервативную замену, способствующую стабильности или облегчающую производство). См., например, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison и Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994. Другие примеры технологии конструирования человеком включают, в качестве неограничивающих примеров, технологию Хома, описанную в патенте США № 5766886.

[0069] В рамках изобретения термин "рекомбинантное гуманизированное антитело" включает все антитела человека, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии гуманизированного антитела, например, из трансфектомы, и антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг всех или части последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК.

[0070] Предпочтительно, мультиспецифические антитела по изобретению являются гуманизированными. Более предпочтительно, мультиспецифические антитела по изобретению являются гуманизированными и содержат полученные из кролика CDR.

[0071] В рамках изобретения термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, связывающемуся с двумя или более разными эпитопами на по меньшей мере двух или более разных мишенях (например, ROR1 и CD3). Термин "мультиспецифическое антитело" включает биспецифическое, триспецифическое, тетраспецифическое, пентаспецифическое и гексаспецифическое. Предпочтительно, мультиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими антителами или триспецифическими антителами, в частности, триспецифическими антителами. В рамках изобретения термин "биспецифическое антитело" относится к антителу, связывающемуся с по меньшей мере двумя разными эпитопами на двух разных мишенях (например, ROR1 и CD3). В рамках изобретения термин "триспецифическое антитело" относится к антителу, связывающемуся с по меньшей мере тремя разными эпитопами на трех разных мишенях (например, ROR1, CD3 и hSA).

[0072] Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и как правило, имеют конкретные трехмерные структурные характеристики, а также

конкретные зарядовые характеристики. "Конформационные" и "линейные" эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей.

[0073] В рамках изобретения термин "конформационный эпитоп" относится к аминокислотным остаткам антигена, собирающимся на поверхности, когда полипептидная цепь сворачивается с образованием нативного белка.

[0074] Термин "линейный эпитоп" относится к эпитопу, где все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) образуются линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно).

[0075] В рамках изобретения термин "распознавать" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, обнаруживающему и взаимодействующему (например, связывающемуся) с конформационным эпитопом.

[0076] В рамках изобретения термин "авидность" относится к информативному показателю общей стабильности или силы комплекса антитело-антиген. Она контролируется тремя основными факторами: аффинность антитела к эпитопу; валентность антигена и антитела; и структурное расположение взаимодействующих частей. В конечном итоге, эти факторы определяют специфичность антитела, то есть вероятность того, что конкретное антитело связывается с точным эпитопом антигена.

[0077] Мультиспецифические антитела по изобретению содержат один или два ROR1-BD.

[0078] Термин "ROR1", в частности, относится к ROR1 человека с UniProt ID Q01973. Соответственно, ROR1-BD по настоящему изобретению нацелен на ROR1 человека, в частности, внеклеточному домену (ECD) ROR1, последовательность которого приведена в таблице 6 (SEQ ID NO: 117). В конкретных вариантах осуществления ROR1-BD связывается с Ig-подобным доменом ROR1. Ig-подобный домен ROR1 определяется остатками 42-147 SEQ ID NO: 117 в соответствии с UniProt ID Q01973. В других конкретных вариантах осуществления ROR1-BD не блокирует связывание Wnt5a с ROR1.

[0079] Соответственно, ROR1-BD, находясь в формате scFv, отличаются одним или более из следующих параметров:

а. связываются с внеклеточным доменом ROR1 человека с моновалентной константой диссоциации (K_D) от 1 пМ до 2 нМ, в частности, с K_D от 1 пМ до 1 нМ, в частности, от 1 до 500 пМ, что измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

б. связываются с экспрессирующими ROR1 человека клетками MDA-MB-231 с EC_{50} от 5 пМ до 10 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 5 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 4 нМ, в частности, с EC_{50} от 5 пМ до 3 нМ.

[0080] В рамках изобретения термин "клетки MDA-MB-231" относится к линии клеток рака молочной железы, экспрессирующей ROR1. Клетки MDA-MB-231 коммерчески доступны и служат модельной линией клеток рака молочной железы

(аденокарциномы).

[0081] В рамках изобретения термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном по отдельным антигенным участкам. В каждом антигенном участке переменная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном через слабые нековалентные силы во множестве участков; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

[0082] Термин "аффинность связывания", как правило, относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена, или более конкретно - эпитопа на антигене). Если не указано иначе, в рамках изобретения термины "аффинность связывания", "связываются с", "связывается с" или "связывание с" относятся к характерной аффинности связывания, отражающей взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, фрагмента антитела и антигена). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерять общепринятыми, известными в этой области способами, включая представленные в настоящем описании. Низкоаффинные антитела, как правило, связываются с антигенами медленно и имеют склонность легко диссоциировать, в то время как высокоаффинные антитела, как правило, связываются с антигенами быстрее и имеют склонность оставаться связанными дольше. В этой области известны различные способы измерения аффинности связывания, любые из которых можно использовать в целях по настоящему изобретению. Конкретные иллюстративные варианты осуществления и примеры вариантов осуществления для измерения аффинности связывания, то есть силы связывания, описаны далее.

[0083] В рамках изобретения термин " K_{assoc} ", " K_a " или " K_{on} ", предназначен для обозначения скорости ассоциации при конкретном взаимодействии антитело-антиген, в то время как в рамках изобретения термин " K_{dis} ", " K_d " или " K_{off} " предназначен для обозначения скорости диссоциации при конкретном взаимодействии антитело-антиген. В одном из вариантов осуществления в рамках изобретения термин " K_D " предназначен для обозначения константы диссоциации, полученной из соотношения K_d и K_a (то есть K_d/K_a) и выраженной в виде молярной концентрации (M). В одном из вариантов осуществления " K_D ", или "значение K_D ", или "KD", или "значение KD" по настоящему изобретению измеряют с использованием анализов поверхностного плазмонного резонанса.

[0084] Аффинность к рекомбинантному ROR1 человека определяли посредством измерений поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в абзацах [0176] и [0192] (scFv) и [0219] и [0242]-[0244] (мультиспецифические молекулы). Аффинности к рекомбинантному CD3 человека, рекомбинантному CD3 яванского макака и рекомбинантному CD3 марьшки определяли посредством измерений поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в абзацах [0208] (scFv) и [0221] и [0247] (мультиспецифические молекулы). Аффинности к рекомбинантному сывороточному альбумину человека (hSA), сывороточному альбумину яванского макака (cSA) и

сывороточному альбумину мыши (mSA) определяли посредством измерений поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в абзацах [0213] (scFv) и [0223] и [0249] (мультиспецифические молекулы).

[0085] В некоторых вариантах осуществления ROR1-BD по настоящему изобретению или ROR1-BD, присутствующие в мультиспецифических антителах по настоящему изобретению, не блокируют связывание Wnt5 α с ROR1.

[0086] Соответственно, ROR1-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, находясь в формате scFv, дополнительно отличаются одним или более из следующих параметров:

c. имеют температуру плавления (T_m), определяемую посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 58°C, в частности, по меньшей мере 59°C, в частности, по меньшей мере 60°C, в частности, по меньшей мере 61°C, в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратного буфера с 150 мМ NaCl при pH 6,4;

d. имеют потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 3%, в частности, менее 2%, в частности, менее 1%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратного буфера с 150 мМ NaCl при pH 6,4; и/или

e. имеют потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 40°C менее 10%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратного буфера с 150 мМ NaCl при pH 6,4; и/или

f. имеют потерю содержания белка после хранения в течение четырех недель при 4°C или 40°C менее 1%, если указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности, где указанные scFv составляют в 50 мМ фосфатно-цитратного буфера с 150 мМ NaCl при pH 6,4.

[0087] Для большинства измерений использовали способ нано-DSF (Prometheus NT.48, NaonTemper) для определения термодинамических свойств scFv и мультиспецифических антител, как описано, например, в абзацах [0197] и [0206] (scFv) и абзацах [0234] и [261] (мультиспецифические форматы). В случае CD3-BD (scFv) использовали способ DSF, как описано в Egan, *et al.*, MAbs, 9(1) (2017), 68-84; Niesen, *et al.*, Nature Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221. В этом способе точку перехода при термическом разворачивании конструкций scFv определяют посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии с использованием флуоресцентного красителя SYPRO® Orange (см. Wong & Raleigh, Protein Science 25 (2016) 1834-1840). Образцы в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4 получают с конечной концентрацией белка 50 мкг/мл и конечной концентрацией 5-кратного SYPRO® Orange в общем объеме 100 мкл. Двадцать пять микролитров подготовленных образцов добавляют в трех параллелях в планшеты для ПЦР ABgene с белыми стенками. Анализ осуществляют с помощью устройства для qPCR, используемого в качестве термоциклера, и флуоресценцию определяют с использованием

функции калибровки красителя в программном обеспечении. Планшет для ПЦР, содержащий тестовые образцы, подвергают воздействию диапазона температур от 25°C до 96°C с шагом 1°C и паузами 30 сек после каждого приращения температуры. Общее время анализа составляет приблизительно 2 ч. T_m вычисляют с помощью программного обеспечения GraphPad Prism с использованием математического вторых производных для вычисления точки перегиба кривой. Регистрируемая T_m представляет собой среднее для трех измерений.

[0088] Потерю содержания мономера определяют посредством вычисления площади под кривой на хроматограммах SE-ВЭЖХ. SE-ВЭЖХ является способом разделения на основе твердой неподвижной фазы и жидкой подвижной фазы, как указано в Фармакопее США (USP), главе 621. Этим способом разделяют молекулы на основе их размера и формы с использованием гидрофобной неподвижной фазы и водной подвижной фазы. Разделение молекул происходит между мертвым объемом (V_0) и полным объемом (V_T) конкретной колонки. Измерения посредством SE-ВЭЖХ осуществляют с помощью системы для ВЭЖХ Chromaster (Hitachi High-Technologies Corporation), оборудованной автоматическим инжектором образцов и УФ-датчиком, установленным на длину волны детекции 280 нм. Оборудование контролируют с помощью программного обеспечения EZChrom Elite (Agilent Technologies, версии 3.3.2 SP2), также поддерживающего анализ получаемых хроматограмм. Образцы белков очищают посредством центрифугирования и удерживают при температуре 4-6°C в автосемплере перед инъекцией. Для анализа образцов scFv используют колонку Shodex KW403-4F (Showa Denko Inc., #F6989202) со стандартизованной подвижной фазой из забуференного физиологического раствора (50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, 300 мМ хлорида натрия) при рекомендуемой скорости потока 0,35 мл/мин. Целевая нагрузка образца на инъекцию составляла 5 мкг. Образцы определяют с помощью УФ-датчика при длине волны 280 нм и регистрируют данные с помощью подходящего пакета программ. Полученные хроматограммы анализируют в диапазоне от V_0 до V_T , таким образом, исключая ассоциированные с матрицей пики со временем элюции >10 мин.

[0089] Соответственно, ROR1-BD мультиспецифических антител по изобретению являются связывающими доменами по изобретению. ROR1-BD мультиспецифических антител по изобретению включают, в качестве неограничивающих примеров, гуманизированные ROR1-BD, последовательности которых приведены в таблице 1.

[0090] Кроме того, мультиспецифические антитела по изобретению содержат один CD3-BD. В конкретных вариантах осуществления указанный CD3-BD связывается с CD3ε. В частности, мультиспецифические антитела по изобретению содержат один CD3BD, нацеленный на CD3ε человека и яванского макака (*Macaca fascicularis*).

[0091] Соответственно, CD3-BD, используемый в настоящем изобретении, находясь в формате scFv, отличается одним или более из следующих параметров:

а) связывается с CD3ε человека с константой диссоциации (K_D) менее 50 нМ, в частности, с K_D от 0,1 до 50 нМ, в частности, от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ,

в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR;

b) связывается с CD3 *Macaca fascicularis* (яванского макака) с K_D менее 50 нМ, в частности, с K_D от 0,1 до 50 нМ, в частности, от 0,1 до 30 нМ, в частности, от 0,1 до 15 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR; и

c) имеет температуру плавления (T_m), определяемую посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 60°C, в частности, по меньшей мере 65°C, более конкретно - по меньшей мере 67°C.

[0092] Соответственно, CD3-BD мультиспецифических антител по изобретению являются связывающими доменами по изобретению. CD3-BD мультиспецифических антител по изобретению включают, в качестве неограничивающих примеров, гуманизированные CD3-BD, последовательности которых приведены в таблице 2.

[0093] Для повышения количества специфичностей/функциональностей при той же или более низкой молекулярной массе полезно использовать антитела, содержащие фрагменты антител, такие как Fv- и Fab-фрагменты и другие фрагменты антител. Эти меньшие молекулы сохраняют антигенсвязывающую активность целого антитела, а также могут демонстрировать улучшенное проникновение в ткань и фармакокинетические свойства по сравнению с целыми молекулами иммуноглобулина. Хотя такие фрагменты кажутся обладающими рядом преимуществ относительно целых иммуноглобулинов, они также обладают недостатком, заключающимся в повышенной скорости клиренса из сыворотки, т.к. в них отсутствует Fc-домен, придающий большое время полужизни *in vivo* (Medasan *et al.*, 1997, J. Immunol. 158:2211-2217). Молекулы с меньшими молекулярными массами более эффективно проникают в целевые ткани (например, солидные злокачественные новообразования) и, таким образом, обладают перспективой улучшенной эффективности при той же или более низкой дозе.

[0094] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление домена, связывающего сывороточный альбумин человека, (hSA-BD) в мультиспецифическое антитело по изобретению не мешает способности других связывающих доменов связываться с соответствующими мишенями. Этот результат является неожиданным, т.к. нельзя априори ожидать, что все три или четыре связывающих домена останутся функциональными без стерического или иного ингибирования друг друга в комплексной ситуации *in vivo* со множеством мишеней и множеством клеток.

[0095] Термин "hSA", в частности, относится к сывороточному альбумину человека с UniProt ID P02768. Сывороточный альбумин человека (hSA) является распространенным белком массой 66,4 кДа в сыворотке человека (50% общего белка), состоящим из 585 аминокислот (Sugio, Protein Eng, Vol. 12, 1999, 439-446). Мультифункциональный белок hSA ассоциирован со своей структурой, делающей возможным связывание и транспорт ряда метаболитов, таких как жирные кислоты, ионы металлов, билирубин и некоторые лекарственные средства (Fanali, Molecular Aspects of Medicine, Vol. 33, 2012, 209-290). Концентрация HSA в сыворотке составляет приблизительно 3,5-5 г/дл. Связывающие альбумин антитела и их фрагменты можно использовать, например, для увеличения

времени полужизни лекарственных средств или конъюгированных с ними белков в сыворотке *in vivo*.

[0096] В некоторых вариантах осуществления hSA-BD получен из моноклонального антитела или фрагмента антитела.

[0097] Подходящие hSA-BD, содержащиеся в мультиспецифических антителах по изобретению, являются связывающими доменами по изобретению. hSA-BD, содержащиеся в мультиспецифических антителах по изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, гуманизированные hSA-связывающие домены, последовательности которых приведены в таблице 3.

[0098] В конкретных вариантах осуществления hSA-BD, содержащиеся в мультиспецифических антителах по изобретению, специфически связываются с hSA и сывороточным альбумином яванского макака (cSA).

[0099] В других конкретных вариантах осуществления hSA-BD, содержащиеся в мультиспецифических антителах по изобретению, специфически связываются с hSA, cSA и сывороточным альбумином мыши (mSA). В этих конкретных вариантах осуществления hSA-BD, содержащиеся в мультиспецифических антителах по изобретению, находясь в формате scFv, отличаются одним или более из следующих параметров:

а) связываются с сывороточным альбумином человека (hSA) с константой диссоциации (K_D) от 0,1 до 10 нМ, в частности, от 0,1 до 5 нМ, что измеряют посредством SPR при pH 5,5 и pH 7,4;

б) связываются с сывороточным альбумином *Macaca fascicularis* (яванского макака) (cSA) с константой диссоциации (K_D) от 0,1 до 10 нМ, в частности, от 0,1 до 5 нМ, что измеряют посредством SPR при pH 5,5 и pH 7,4; и

с) связываются с сывороточным альбумином мыши (mSA) с константой диссоциации (K_D) от 0,1 до 20 нМ, в частности, от 0,1 до 10 нМ, что измеряют посредством SPR при pH 5,5 и pH 7,4.

[0100] Другой подходящий hSA-BD для использования в мультиспецифическом антителе по изобретению содержит или получен из антитела, выбранного из группы, состоящей из: (i) полипептидов, связывающихся с сывороточным альбумином (см., например, Smith *et al.*, 2001, Bioconjugate Chem. 12:750-756; EP0486525; US6267964; WO 2004/001064; WO 2002/076489; и WO 2001/45746); (ii) отдельные связывающие переменные домены против сывороточного альбумина, описанные в Holt *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, 5, pp283-288, WO 2004/003019, WO 2008/096158, WO 2005/118642, WO 2006/0591056 и WO 2011/006915; (iii) антитела против сывороточного альбумина, описанные в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO 2011/086091.

[0101] В конкретных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению содержит: (i) один ROR1-BD; (ii) один CD3-BD и (iii) один hSA-BD, то есть мультиспецифические антитела по этим конкретным вариантам осуществления являются моновалентными по всем трем специфичностям к ROR1, CD3 и hSA.

[0102] В дополнительных конкретных вариантах осуществления

мультиспецифическое антитело по изобретению содержит: (i) два ROR1-BD; (ii) один CD3-BD и (iii) один hSA-BD, то есть мультиспецифические антитела по этим конкретным вариантам осуществления являются бивалентными по специфичности к ROR1 и моновалентными по специфичностям к CD3 и к hSA.

[0103] Термин "поливалентное антитело" относится к отдельной связывающей молекуле с несколькими валентностями, где "валентность" описывают как количество антигенсвязывающих остатков, связывающихся с эпитопами на молекулах-мишенях. В связи с этим, отдельная связывающая молекула может связываться с более чем одним участком связывания на молекуле-мишени и/или более чем одной молекулой-мишенью из-за наличия более чем одной копии соответствующих антигенсвязывающих остатков. Неограничивающие примеры поливалентных антител включают бивалентные антитела, тривалентные антитела, тетравалентные антитела, пентавалентные антитела, гексавалентные антитела и т.п.

[0104] В рамках изобретения термин "моновалентное антитело" относится к антителу, связывающемуся с одной молекулой-мишенью, и более конкретно - с одним эпитопом на молекуле-мишени. Кроме того, в рамках изобретения термин "связывающий домен" или "моновалентный связывающий домен" относится к связывающему домену, связывающемуся с одним эпитопом на молекуле-мишени.

[0105] В случае если мультиспецифические антитела по изобретению содержат два ROR1-BD, указанные два ROR1-BD связываются с одним и тем же эпитопом или разными эпитопами на внеклеточном домене ROR1. Предпочтительно, два ROR1-BD связываются с одним и тем же эпитопом на внеклеточном домене ROR1.

[0106] В рамках изобретения термин "один и тот же эпитоп", относится к отдельной белковой детерминанте на белке, способной связываться с более чем одним антителом, где отдельная белковая детерминанта является идентичной, то есть состоит из идентичных, химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, имеющих идентичные трехмерные структурные характеристики, а также идентичные зарядовые характеристики для каждого из указанных антител. В рамках изобретения термин "иной эпитоп" в отношении конкретного белка-мишени относится к отдельным белковым детерминантам на белке, каждая из которых может специфически связываться с иным антителом, где эти отдельные белковые детерминанты не являются идентичными для разных антител, то есть состоят из неидентичных химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, имеющих разные трехмерные структурные характеристики, а также разные зарядовые характеристики. Эти разные эпитопы могут являться перекрывающимися или неперекрывающимися.

[0107] В конкретных вариантах осуществления мультиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими и бивалентными.

[0108] В дополнительных конкретных вариантах осуществления, мультиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими и

тривалентными.

[0109] В дополнительных конкретных вариантах осуществления, мультиспецифические антитела по изобретению являются триспецифическими и тривалентными.

[0110] В дополнительных конкретных вариантах осуществления, мультиспецифические антитела по изобретению являются триспецифическими и тетравалентными.

[0111] Другие переменные домены, используемые в настоящем изобретении, включают аминокислотные последовательности, подвергнутые мутации, но имеющие по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях CDR, при этом области CDR, показанные в последовательностях, приведены в таблицах 1, 2 и 3. Другие переменные домены, используемые в настоящем изобретении включают, мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот подвергнуты мутации в областях CDR по сравнению с областями CDR, показанных в последовательности, приведенной в таблицах 1, 2 и 3.

[0112] Соответственно, домены VH связывающих доменов мультиспецифических антител по изобретению принадлежат или выбраны из семейства VH антител человека. В предпочтительных вариантах осуществления домены VH одного или двух ROR1-BD, CD3-BD и, при наличии, hSA-BD мультиспецифических антител по изобретению принадлежат к подтипам каркаса VH1a, VH1b, VH3 или VH4. В одном конкретном варианте осуществления указанные домены VH принадлежат к подтипу каркаса VH VH3 или VH4, конкретно - к подтипу каркаса VH VH3.

[0113] В контексте настоящего изобретения термин "принадлежит к подтипу каркаса VH_x (или подтипу каркаса V_κX/V_λ)" или "выбран из подтипа каркаса VH_x (или подтипа каркаса V_κX/V_λ)" означает, что каркасные последовательности VH/VL FR1-FR4 (в настоящем описании также обозначаемые как каркасные области VH/VL FR1-FR4) демонстрируют наибольшую степень гомологии с указанным подтипом каркаса VH_x или V_κX/V_λ антитела человека.

[0114] Примеры последовательностей VH1a, VH1b, VH3 и VH4, и примеры других последовательностей VH_x приведены в Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86 или WO 2019/057787. Конкретный пример домена VH, принадлежащего к семейству VH3, представлен в SEQ ID NO: 71, и конкретный пример домена VH, принадлежащего к подтипу каркаса VH1a, VH1b или VH4, приведен в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 (таблица 4, каркасные области указаны не полужирным шрифтом). В частности, каркасные области FR1-FR4 взяты из SEQ ID NO: 71, принадлежащей к семейству VH3 (таблица 4, области, указанные не полужирным шрифтом). Соответственно, в рамках изобретения VH, принадлежащая к семейству VH3, является VH, содержащей FR1-FR4, имеющие по меньшей мере 85%, в частности, по меньшей мере 90%, более конкретно, по меньшей мере 95% идентичности последовательности в отношении FR1-FR4 SEQ ID NO: 71. Альтернативные примеры последовательностей VH3 и VH4 и примеры других последовательностей VH_x можно

найти в Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86 или WO 2019/057787.

[0115] Соответственно, домены VL связывающих доменов, используемых в настоящем изобретении, содержат: каркасы V_κ FR1, FR2 и FR3, в частности, каркасы V_{κ1} или V_{κ3}, в частности, V_{κ1} каркасы FR1-FR3 и каркас FR4, выбранный из FR4 V_κ. В случае если указанные связывающие домены имеют формат scFv, указанные связывающие домены содержат: каркасы V_κ FR1, FR2 и FR3, в частности, каркасы V_{κ1} или V_{κ3}, в частности, каркасы V_{κ1} FR1-FR3 и каркас FR4, выбранный из FR4 V_λ.

[0116] Подходящие каркасы V_{κ1} FR1-FR3, а также примеры FR4 V_λ приведены в SEQ ID NO: 75 (таблица 4, каркасные области указаны неполу жирным шрифтом). Альтернативные примеры последовательностей V_{κ1} и примеры последовательностей V_{κ2}, V_{κ3} или V_{κ4} можно найти в Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86. Подходящие каркасы V_{κ1} FR1-FR3 содержат аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95 процентов идентичности в отношении аминокислотных последовательностей, соответствующих FR1-FR3 и взятых из SEQ ID NO: 75 (таблица 4, каркасные области указаны неполу жирным шрифтом). Подходящие FR4 V_λ приведены в SEQ ID NO: 76-82 и SEQ ID NO: 83, содержащей один остаток цистеина, в частности, в случае если второй отдельный остаток цистеина присутствует в соответствующей цепи VH, в частности, в положении 51 (нумерация AHo) VH, для образования междоменной дисульфидной связи. В одном из вариантов осуществления домены VL связывающих доменов мультиспецифических антител по изобретению, находясь в формате scFv, содержит FR4 V_λ, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85, 90, 95 процентов идентичности в отношении аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 76-83, конкретно - SEQ ID NO: 76 или 83.

[0117] В частности, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению содержат домены VH, приведенные в таблицах 1, 2 и 3. Соответственно, связывающие домены, используемые в настоящем изобретении, содержат аминокислотную последовательность VH, приведенную в одной из таблиц 1, 2 и 3, где не более 10 аминокислот в каркасных последовательностях (то есть последовательностях, не являющихся последовательностями CDR) подвергнуты мутации (где мутация в различных неограничивающих примерах является добавлением, заменой или делецией). Соответственно, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению содержат аминокислотную последовательность VH, приведенную в одной из таблиц 1, 2 и 3, где не более 7 аминокислот, в частности не более 5, 4, 3 или 2 аминокислот, в частности не более 1 аминокислоты, в каркасных последовательностях (то есть последовательностях, не являющихся последовательностями CDR) подвергнуты мутации (где мутация в различных неограничивающих примерах является добавлением, заменой или делецией). Другие связывающие домены, используемые в настоящем изобретении, включают аминокислоты, подвергнутые мутации, но имеющие по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях VH в отношении областей VH,

показанных в соответствующих последовательностях, приведенных в одной из таблиц 1, 2 и 3, включая домены VH, содержащие по меньшей мере положения 5-140 (нумерация АНо), в частности, по меньшей мере положения 3-145, более конкретно - по меньшей мере положения 2-147 одной из последовательностей, приведенных в таблицах 1, 2 и 3, при условии, что такие домены VH демонстрируют функциональные признаки, определенные в пп.11 и 19.

[0118] В конкретных вариантах осуществления один или два ROR1-BD, CD3-BD и, при наличии, hSA-BD мультиспецифических антител по изобретению содержат домены VH, как определено выше, где каркасные области FR1, FR2, FR3 и FR4 указанных доменов VH имеют следующие замены (нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144. Указанные домены VH в настоящем описании можно обозначать как "варианты доменов VH", или "модифицированные домены VH", или "улучшенные домены VH". Аналогично, связывающие домены, содержащие указанные домены VH в настоящем описании можно обозначать как "варианты связывающих доменов", или "модифицированные связывающие домены", или "улучшенные связывающие домены". Конкретными примерами таких вариантов доменов VH являются домены VH SEQ ID NO: 8, 11, 21, 24, 37, 66 и 69.

[0119] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что указанные модифицированные ROR1-, CD3- и hSA-BD, находясь в формате scFv, демонстрируют значимо сниженную иммуногенность по сравнению с версиями указанных связывающих доменов, не содержащими указанные выше замены в каркасных областях VH. Более конкретно, указанные модифицированные ROR1-, CD3- и hSA-BD, находясь в формате scFv, демонстрируют сниженное связывание с уже существующими антителами против лекарственных средств (ADA), находящимися в сыворотке человека, в частности, сниженное связывание с уже существующими ADA, по сравнению с версиями указанных связывающих доменов, не содержащими указанные выше замены в каркасных областях VH, что определяют с помощью анализа связывания уже существующих ADA, в частности, что определяют с помощью анализа связывания уже существующих ADA, определенного в примере 10.

[0120] В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мультиспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие указанные модифицированные ROR1-, CD3- и hSA-BD, демонстрируют значимо сниженную иммуногенность по сравнению с версиями мультиспецифических антител по настоящему изобретению, не содержащими указанные модифицированные связывающие домены. Более конкретно, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие указанные модифицированные ROR1-, CD3- и hSA-BD, демонстрируют сниженное связывание с уже существующими антителами против лекарственных средств (ADA), находящимися в сыворотке человека, в частности, сниженное связывание с уже существующими ADA, по сравнению с версиями мультиспецифических антител по

настоящему изобретению, несодержащими указанные модифицированные связывающие домены, что определяют с помощью анализа связывания уже существующих ADA, в частности, что определяют с помощью анализа связывания уже существующих ADA, определенного в примере 10.

[0121] Иммуногенность, то есть склонность терапевтического белка индуцировать гуморальный ответ в организме пациента, например, можно прогнозировать по возможности его распознавания антителами против лекарственных средств (ADA), уже присутствующих в сыворотках здоровых и неподвергнутых лечению индивидуумов, в настоящем описании обозначаемыми как "уже существующие ADA".

[0122] Таким образом, в целях по настоящему изобретению в рамках изобретения термин "иммуногенность" относится к способности терапевтического белка, например, антитела, фрагмента антитела или связывающего домена антитела, распознаваться уже существующими ADA в образцах сыворотки человека. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что связывание уже существующих ADA, а также индуцирование образования ADA во время терапевтического лечения связано с возникновением В-клеточных и/или Т-клеточных эпитопов на терапевтическом белке. Степень такой иммуногенности можно определять посредством анализа ELISA и выражать как процент образцов сыворотки человека, содержащих измеримые количества уже существующих ADA и/или ADA, образовавшихся во время терапевтического лечения, распознающих, то есть связывающих, интересующий терапевтический белок, относительно общего количества тестируемых сывороток человека (процент положительных образцов сыворотки). Снижение иммуногенности между терапевтическим белком и соответствующим терапевтическим белком, модифицированным для снижения его иммуногенности, можно измерять посредством сравнения процента положительных образцов сыворотки против модифицированного терапевтического белка с процентом положительных образцов сыворотки против исходного терапевтического белка. Меньшее количество или процент положительных образцов сыворотки в случае модифицированного терапевтического белка свидетельствует о снижении иммуногенности относительно исходного терапевтического белка.

[0123] Образец сыворотки считают содержащим измеримые количества уже существующих ADA, если сигнал ELISA превышает некоторое пороговое значение. Это пороговое значение в настоящем описании также обозначают как пороговую точку скрининга (SCP). SCP можно вычислять, как определено ниже или устанавливать на произвольном значении относительно максимального сигнала ELISA, полученного для тестируемых сывороток (например, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% максимального сигнала ELISA, полученного для тестируемых сывороток). Предпочтительно, SCP вычисляют, как определено ниже.

[0124] В частности, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению содержат домен VL, приведенный в одной из таблиц 1, 2 и 3. Соответственно, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению содержат

аминокислотную последовательность VL, приведенную в одной из таблиц 1, 2 и 3, где не более приблизительно 10 аминокислот в каркасных последовательностях (то есть последовательностях, не являющихся последовательностями CDR) подвергнуты мутации (где мутация в различных неограничивающих примерах является добавлением, заменой или делецией). Соответственно, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению содержат аминокислотную последовательность VL, приведенную в одной из таблиц 1, 2 и 3, где не более приблизительно 10 аминокислот, в частности не более 7 аминокислот, в частности не более 5, 4, 3, 2 аминокислот, в частности не более 1 аминокислоты в каркасных последовательностях (то есть последовательностях, не являющихся последовательностями CDR) подвергнуты мутации (где мутация в различных неограничивающих примерах является добавлением, заменой или делецией). Другие связывающие домены, используемые в настоящем изобретении, включают аминокислоты, подвергнутые мутации, но имеющие по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях VL в отношении области VL, показанной в последовательностях, приведенных в таблицах 1, 2 и 3, включая домены VL, содержащие по меньшей мере положения 5-140 (нумерация АНо), в частности по меньшей мере положения 3-145, более конкретно - по меньшей мере положения 2-147 одной из последовательностей, приведенных в таблицах 1, 2 и 3, при условии, что такие домены VL демонстрируют функциональные признаки, определенные выше в пп. 11 и 19.

[0125] В контексте настоящего изобретения термин "связывающий домен, используемый в настоящем изобретении" относится к связывающему домену как таковому, то есть независимо от мультиспецифического контекста, и в частности, к связывающему домену, содержащемуся в мультиспецифической конструкции, например, одному из связывающих доменов, содержащихся в биспецифической, триспецифической или тетраспецифической конструкции.

[0126] Соответственно, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из: Fab, F(ab)₂, Fv, scFv, dsFv и scAb; в частности, из группы, состоящей из: Fv, scFv и dsFv. В частности, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению представляют собой scFv.

[0127] Соответственно, связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению функционально связаны. Связывающие домены мультиспецифических антител по изобретению могут связываться с соответствующими антигенами или рецепторами одновременно. Термин "одновременно", как используют в этом контексте, относится к одновременному связыванию по меньшей мере одного из ROR1-BD и CD3-BD с соответствующими антигенами, или, в случае если в мультиспецифическом антителе присутствуют два ROR1-BD, термин "одновременно" относится к одновременному связыванию обоих ROR1-BD и CD3-BD с соответствующими антигенами.

[0128] Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению содержат один или два ROR1-BD, один CD3-BD и, необязательно, один hSA-BD, где указанные один или

два ROR1-BD, указанный CD3-BD и указанный необязательный hSA-BD функционально связаны друг с другом.

[0129] В рамках изобретения термин "функционально связанный" означает, что две молекулы (например, полипептиды, домены, связывающие домены) соединены таким образом, что каждая молекула сохраняет функциональную активность. Две молекулы могут являться "функционально связанными", соединены ли они прямо или косвенно (например, через линкер, через функциональный фрагмент, через линкер с функциональным фрагментом). Термин "линкер" относится к пептидному или другому функциональному фрагменту, необязательно, находящемуся между связывающими доменами или фрагментами антител, используемыми в настоящем изобретении. Можно использовать ряд стратегий для ковалентного связывания молекул друг с другом. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, полипептидные связи между N- и C-концами белков или белковых доменов, соединение через дисульфидные связи и соединение с помощью химических перекрестно сшивающих реагентов. В одном из аспектов этого варианта осуществления линкер представляет собой пептидную связь, полученную с помощью рекомбинантных способов или пептидного синтеза. Выбор подходящего линкера для конкретного случая, когда необходимо соединить две полипептидные цепи, зависит от различных параметров, включая, в качестве неограничивающих примеров, природу двух полипептидных цепей (например, олигомеризуются ли они естественным образом), расстояние между N- и C-концами, которые необходимо соединить, если оно известно, и/или стабильность линкера в отношении протеолиза и окисления. Кроме того, линкер может содержать аминокислотные остатки, обеспечивающие гибкость.

[0130] В контексте настоящего изобретения термин "полипептидный линкер" относится к линкеру, состоящему из цепи аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, соединяющими два домена, каждый из которых соединен с одним концом линкера. Полипептидный линкер должен обладать длиной, достаточной для связывания двух молекул таким образом, что они принимают правильную конформацию относительно друг друга так, что они сохраняют желаемую активность. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер имеет непрерывную цепь из 2-30 аминокислотных остатков (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков). Кроме того, аминокислотные остатки, выбранные для включения в полипептидный линкер, должны проявлять свойства, не мешающие значительно активности полипептида. Таким образом, линкерный пептид в целом не должен иметь заряд, который не будет соответствовать активности полипептида, или будет мешать внутреннему фолдингу, или будет образовывать связи или другие взаимодействия с аминокислотными остатками в одном или более мономеров, которые будут серьезно нарушать связывание мономерных доменов рецептора. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер является неструктурированным полипептидом. Линкеры, которые можно использовать, включают глицин-сериновые или GS-линкеры. Термины "Gly-Ser" или "GS"-линкеры означают

полимер из последовательных глицинов и серинов (включая, например, (Gly-Ser)_n, (GSGGS)_n [SEQ ID NO: 118], (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 119] и (GGGS)_n [SEQ ID NO: 120], где n является целым числом из по меньшей мере одного), также можно использовать глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, такие как связь для калиевого канала Shaker, и широкий спектр других гибких линкеров, как будет понятно специалистам в этой области. Глицин-сериновые полимеры являются предпочтительными, т.к. олигопептиды, содержащие эти аминокислоты, являются относительно неструктурированными и, таким образом, могут служить в качестве нейтральной связи между компонентами. Во-вторых, серин является гидрофильным и, таким образом, может сольбилизовать то, что может являться глобулярной глициновой цепью. В-третьих, показано, что схожие цепи эффективны для соединения субъединиц рекомбинантных белков, таких как одноцепочечные антитела.

[0131] В группе вариантов осуществления мультиспецифическое антитело находится в формате, выбранном из любого подходящего формата, известного в этой области, являющегося по меньшей мере триспецифическими и несодержащим Fc-области иммуноглобулина и области CH1 и/или CL. Это включает, в качестве неограничивающего примера, форматы на основе тандемного три-scFv (тройного антитела), триатела, scDb-scFv; тандемного три-scFv или scDb-scFv, слитого с N- и/или C-концом иного домена гетеродимеризации, чем гетеродимерные Fc-домены, и MATCH (описанные в WO 2016/0202457; Egan T. *et al.*, MABS 9 (2017) 68-84). В частности, формат мультиспецифического антитела выбран из из scDb-scFv, scMATCH3, MATCH3 и MATCH4.

[0132] Термин "scDB" или "одноцепочечные диатела" относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где фрагменты содержат VH, соединенную с VL в одной полипептидной цепи (VH-VL). Используя линкер, который слишком короток, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на одной цепи, домены заставляют спариваться с комплементарными доменами другой цепи для получения двух антигенсвязывающих участков. Одноцепочечные диатела могут являться бивалентными или биспецифическими, предпочтительно - биспецифическими. Одноцепочечные диатела подробнее описаны, например, в EP404097, WO 93/01161, Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003) и Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела описаны в Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

[0133] Биспецифическое scDb, в частности, биспецифическое мономерное scDb, в частности, содержит два переменных домена тяжелой цепи (VH) или их фрагменты и два переменных домена легкой цепи (VL) или их фрагменты, соединенные линкерами L1, L2 и L3 в порядке VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB или VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB, где домены VLA и VHA совместно образуют антигенсвязывающий участок для первого антигена, и VLB и VHB совместно образуют антигенсвязывающий участок для

второго антигена.

[0134] Линкер L1, в частности, является пептид из 2-10 аминокислот, более конкретно - 3-7 аминокислот, и наиболее конкретно - 5 аминокислот, и линкер L3, в частности, является пептидом из 1-10 аминокислот, более конкретно - 2-7 аминокислот, и наиболее конкретно - 5 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер L1 и/или L3 содержит одну или две единицы из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 121], где n=1 [SEQ ID NO: 85] или 2 [SEQ ID NO: 86], в частности, n=1.

[0135] Средний линкер L2, в частности, является пептидом из 10-40 аминокислот, более конкретно - 15-30 аминокислот, и наиболее конкретно - 20-25 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления указанный линкер L2 содержит одну или более единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 122], где n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, в частности, n=4 [SEQ ID NO: 84].

[0136] В одном из вариантов осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению содержит один ROR1-BD, один CD3-BD и один hSA-BD и является одноцепочечным белком, имеющим формат scDb-scFv или scMATCH3. Термин "scDb-scFv" относится к формату антитела, где одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) подвергнут слиянию с помощью гибкого линкера Gly-Ser с одноцепочечным диателом (scDb). В одном из вариантов осуществления указанный гибкий линкер Gly-Ser является пептидом из 2-40 аминокислот, например, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10 аминокислот, в частности, 10 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления указанный линкер содержит одну или более единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 122], где n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, в частности, n=2 [SEQ ID NO: 86]. В частности, одноцепочечные мультиспецифические антитела по этому варианту осуществления находятся в формате scMATCH3.

[0137] Конкретными, но неограничивающими примерами мультиспецифических антител scMATCH3 по изобретению являются PRO2286, PRO2287, PRO22507, PRO2508, PRO2509, PRO2510, PRO2557, PRO2596, PRO2667 и PRO2668, последовательности которых приведены в таблице 5.

[0138] В другом варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению содержит два ROR1-BD, один CD3-BD и один hSA-BD и является гетеродимерным белком в формате MATCH4, описанном в WO 2016/0202457; Egan T., *et al.*, MABS 9 (2017) 68-84.

[0139] Конкретными, но неограничивающими примерами гетеродимерных мультиспецифических антител MATCH4 по изобретению являются PRO2589, PRO2590, PRO2591, PRO2592, PRO2658, PRO2659, PRO2669 и PRO2670, последовательности которых приведены в таблице 5.

[0140] Мультиспецифические антитела по изобретению или и фрагменты или связывающие домены, такие как ROR1-BD, можно получать любым общепринятым

способом получения антител, известным в этой области способ (см., например, Fischer, N. & Leger, O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14 в отношении получения биспецифических конструкций; Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., *Methods Mol. Biol.* 907 (2012)713-727 и WO 99/57150 в отношении биспецифических диател и тандемных scFv). Конкретные примеры подходящих способов получения биспецифической конструкции дополнительно включают, помимо прочего, технологии Genmab (см. Labrijn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 5145-5150) и Merus (см. de Kruif *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 741-750).

[0141] Эти способы, как правило, включают получение моноклональных антител и комбинирование антигенсвязывающих доменов или фрагментов или их частей из двух или более разных моноклональных антител для получения биспецифической или мультиспецифической конструкции известными способами молекулярного клонирования.

[0142] Мультиспецифические антитела по изобретению можно получать посредством конъюгации отдельных специфичностей связывания известными в этой области способами. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Если специфичность связывания определяют белки или пептиды, можно использовать различные связывающие или перекрестно сшивающие средства для ковалентной конъюгации. Примеры перекрестно сшивающих средств включают протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-5-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky *et al.*, 1984 *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, M A *et al.*, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают описанные в Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.*, 1985 *Science* 229:81-83, и Glennie *et al.*, 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375. Средствами конъюгации являются SATA и сульфо-SMCC, оба из которых доступны в Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill., USA).

[0143] Если специфичность связывания определяется антителами, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления шарнирная область модифицирована так, чтобы содержать нечетное количество сульфгидрильных остатков, например, один, перед конъюгацией.

[0144] Альтернативно, две или более специфичности связывания могут быть закодированы в одном векторе и экспрессироваться и собираться в одной клетке-хозяине. Этот способ особенно подходит, если биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb×Fab, mAb×scFv, mAb×dsFv или mAb×Fv. Способы получения мультиспецифических антител и молекул описаны, например, в патентах США №№ 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

[0145] Связывание мультиспецифических антител с их специфическими мишенями можно подтвердить посредством, например, твердофазного иммуноферментного анализа

(ELISA), радиоиммунологического анализа (REA), анализа FACS, биологического анализа (например, ингибирования роста), или анализа вестерн-блоттинга. С помощью каждого из этих анализов, как правило, определяют наличие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием реагента для мечения (например, антитела), специфического для интересующего комплекса.

[0146] В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте или двум нуклеиновым кислотам, кодирующим мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты или связывающие домены, такие как ROR1-BD. Такие нуклеиновые кислоты можно оптимизировать для экспрессии в клетках млекопитающих.

[0147] Термин "нуклеиновая кислота" используют в настоящем описании взаимозаменяемо с термином "полинуклеотиды", и он относится к одному или более дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин включает нуклеиновые кислоты, содержащий известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки остова или связи, являющиеся синтетическими, природными и неприродными, имеющие схожие связывающие свойства в качестве референсной нуклеиновой кислоты и метаболизируемые аналогично референсным нуклеотидам. Неограничивающие примеры таких аналогов включают фосфотиоаты, фосфоамидаты, метилфосфонаты хиральные метилфосфаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA). Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также потенциально включает их консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также конкретно указанные последовательности. В частности, как описано ниже, замен вырожденных кодонов можно достигать, получая последовательности, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено смешанным основанием и/или остатками дезоксиинозина (Batzler *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

[0148] Изобретение относится к в значительной степени очищенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептиды, содержащие сегменты или домены мультиспецифического антитела, как описано выше, такие как ROR1-BD. При экспрессии с подходящих экспрессирующих векторов, полипептиды, кодируемые этими молекулами нуклеиновой кислоты, могут демонстрировать антигенсвязывающие возможности мультиспецифического антитела или ROR1-BD по настоящему изобретению.

[0149] Полинуклеотидные последовательности можно получать с помощью *de novo* твердофазного синтеза ДНК или ПЦР-мутация существующей последовательности (например, последовательностей, описанных в примерах ниже), кодирующей мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты или связывающие домены, такие как ROR1-BD по изобретению. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять известными в этой области способами, такими как фосфотриэфирный способ при Narang *et al.*, 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; фосфодиэфирный

способ по Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; диэтилфосфоамидатный способ по Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; и твердофазный способ по патенту США № 4458066. Встраивание мутаций в полинуклеотидную последовательность посредством ПЦР можно осуществлять, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[0150] Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения мультиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов или связывающих доменов, таких как ROR1-BD.

[0151] Термин "вектор" предназначен для обозначения полинуклеотидной молекулы, способной к транспорту другого полинуклеотида, с которым она связана. Одним из типов вектора является "плаزمид", которая означает замкнутую кольцевую двухцепочечную ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую ее встраивают (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно встраивать в геном клетки-хозяина после встраивания в клетку-хозяина, и, таким образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина.

[0152] Кроме того, некоторые векторы могут направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем описании как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). В основном, экспрессирующие векторы, подходящие для способов рекомбинантной ДНК, зачастую находятся в форме плазмид. В настоящем описании термин "плаزمид" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, т.к. плазмид является наиболее общеупотребительной формой вектора. Однако изобретение предназначено для включения таких других форм экспрессирующих векторов, таких как вирусные векторы (например, репликативно-дефектные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции. В этом конкретном контексте термин "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными сегментами (например, ДНК). Как правило, он относится к функциональной взаимосвязи транскрипционной регуляторной последовательности и транскрибируемой последовательности. Например, промотор или энхансерная последовательность функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они стимулируют или модулируют транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, промоторные последовательности регуляции транскрипции, функционально

связанные с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, то есть, они являются цис-действующими. Однако, некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, могут не являться физически смежными или локализоваться в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

[0153] Различные экспрессирующие векторы можно использовать для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи мультиспецифического антитела или их фрагменты или связывающие домены, такие как ROR1-BD. И вирусные, и невирусные экспрессирующие векторы можно использовать для получения антител в клетке-хозяине млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с экспрессирующей кассетой для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington *et al.*, *Nat Genet.* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, которые можно использовать для экспрессии ИЛ-4R-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, человека) включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, San Diego, USA), векторы MPS V и многочисленные другие векторы, известные в этой области, для экспрессии других белков. Вирусные векторы, которые можно использовать, включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторов на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НБР, векторов на основе осповакцины и вируса леса Самклики (SFV). См., Brent *et al.*, выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld *et al.*, *Клетка* 68: 143, 1992.

[0154] Выбор экспрессирующего вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых вектор должен экспрессироваться. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), функционально связанные с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент мультиспецифического антитела. В одном из вариантов осуществления используют индуцибельный промотор для предотвращения экспрессии встроенных последовательности кроме как в условиях индуцирования. Индуцибельные промоторы включают, например, промотор арабинозы, lacZ, мателлотинеина или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно подвергать экспансии в неиндуцирующих условиях без отклонения популяции по кодирующим последовательностям, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, другие регуляторные элементы также могут являться необходимыми или желательными для эффективной экспрессии цепи или фрагмента мультиспецифического антитела. Эти элементы, как правило, включают инициаторный кодон ATG и смежный участок связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повышать посредством включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125, 1994; и Bittner *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:516,

1987). Например, можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV для повышения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

[0155] Векторы, которые можно использовать, как правило, кодируют переменные домены легкой и тяжелой цепи мультиспецифического антитела. В некоторых случаях они также кодируют константные области или их части. Такие векторы делают возможной экспрессию переменных областей в виде слитых белков с константными областями, таким образом, приводя к получению интактных антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Как правило, такие константные области принадлежат человеку.

[0156] Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую встраивают рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины должны относиться не только к конкретной рассматриваемой клетке, но и к потомству такой клетки. Т.к. некоторые модификации могут возникать в последующих поколениях по причине мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство, фактически, может не являться идентичным родительской клетке, но все равно входит в объем термина "клетка-хозяин" в рамках изобретения.

[0157] Клетки-хозяева для удержания и экспрессии мультиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов или связывающих доменов, таких как ROR1-BD, могут являться прокариотическими или эукариотическими. *E. coli* представляют одного из прокариотических хозяев, которые можно использовать для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы-хозяева, подходящие для использования, включают бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно включать экспрессирующие векторы, как правило, содержащие последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяйинной (например, участок начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество из широкого спектра хорошо известных промоторов, такие как система лактозного промотора, система триптофанового (*trp*) промотора, система бета-лактамазного промотора или промоторная система фага лямбда. Промоторы, как правило, контролируют экспрессию, необязательно, с помощью последовательности оператора и имеют последовательности участка связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также можно использовать для экспрессии мультиспецифических антител по изобретению. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

[0158] В одном из вариантов осуществления клетки-хозяева млекопитающих используют для экспрессии и продуцирования мультиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов или связывающих доменов, таких как ROR1-BD. Например, они могут являться гибридной линией клеток, экспрессирующей эндогенные гены иммуноглобулинов, или линией клеток млекопитающего, несущей экзогенный экспрессирующий вектор. Они включают любые нормальные мортальные или нормальные

или аномальные иммортализованные клетки животного или человека. Например, разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов, в целом, описано, например, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как участок начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen, *et al.*, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), и необходимые участки обработки информации, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Эти экспрессирующие векторы, как правило, содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут являться конститутивными, специфическими для типа клеток, стадийспецифическими и/или модулируемыми или регулируемыми. Промоторы, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, промотор металлотioneина, основной поздний конститутивный промотор аденовируса, дексаметазон-индуцибельный промотор MMTV, промотор SV40, промотор polIII MRP, конститутивный промотор MPS V, тетрациклин-индуцибельный промотор CMV (такой как предранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в этой области.

[0159] Способы встраивания экспрессирующих векторов, содержащих интересующие полинуклеотиды, варьируются в зависимости от типа клеток-хозяев. Например, трансфекцию с хлоридом кальция, как правило, используют для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (см., в целом, Green, M. R., and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион-нуклеиновая кислота, "голую" ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленный реагентами захват ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом зачастую желательной будет стабильная экспрессия. Например, линии клеток, стабильно экспрессирующие мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты или связывающие домены, такие как ROR1-BD, можно получать с использованием экспрессирующих векторов по изобретению, содержащих вирусные участки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективного маркера. После встраивания вектора клеткам можно позволить расти в течение от 1 до 2 дней в обогащенных средах перед переносом на селективные среды. Целью селективного

маркера является придание резистентности к селекции, и его наличие делает возможным рост клеток, успешно экспрессирующих встроенные последовательности в селективных средах. Резистентные, стабильно трансфицированные клетки можно подвергать пролиферации с использованием способов культивирования тканей, подходящих для типа клеток. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела по изобретению или его антигенсвязывающих фрагментов, таких как ROR1-BD, где указанный способ включает стадию культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий мультиспецифическое антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как ROR1-BD, в результате чего экспрессируется указанное мультиспецифическое антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как ROR1-BD.

[0160] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела или ROR1-BD по изобретению, включающему стадию культивирования клетки-хозяина, экспрессирующей нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическое антитело или ROR1-BD по изобретению. В частности, настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела или ROR1-BD по изобретению, включающему (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот, кодирующих мультиспецифическое антитело или ROR1-BD по изобретению, или одного вектора или двух векторов, кодирующих мультиспецифическое антитело или ROR1-BD по изобретению, экспрессию указанной нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот или указанного вектора или векторов и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного ROR1-BD из системы экспрессии или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев, экспрессирующих нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие мультиспецифическое антитело или ROR1-BD по изобретению, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев и сбор указанного мультиспецифического антитела или указанного ROR1-BD из культуры клеток.

[0161] В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает среду или дилуент, не нарушающие структуру антител. Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию или облегчают получение композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., являющиеся физиологически совместимыми.

[0162] Некоторые из таких носителей позволяют составлять фармацевтические композиции, например, в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и пастилок для перорального приема индивидуумом. Некоторые из таких носителей позволяют составлять фармацевтические композиции для инъекции, инфузии

или топического введения. Например, фармацевтически приемлемый носитель может являться стерильным водным раствором.

[0163] Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить различными, известными в этой области способами. Путь и/или способ введения варьируется в зависимости от желаемых результатов. Введение может являться внутривенным, внутримышечным, интраперитонеальным или подкожным или проксимальным к целевому участку. Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии), в частности, для внутримышечного или подкожного введения. В зависимости от пути введения, активное соединение, то есть мультиспецифическое антитело по изобретению, можно покрывать материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

[0164] Фармацевтические композиции по изобретению можно получать способами, хорошо известными и общепринято практикуемыми в этой области. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно производят в соответствии с требованиями GMP. Как правило, в фармацевтических композициях по изобретению используют терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу мультиспецифического антитела по изобретению. Мультиспецифические антитела по изобретению составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы общепринятыми способами, известными специалистам в этой области. Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить отдельный болюс, можно вводить несколько дробных доз за период времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от требований терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозы. В рамках изобретения термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, соответствующим однократным дозам для индивидуумов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, вычисленное для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем.

[0165] Точные уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по изобретению можно варьировать так, чтобы получать количество активного ингредиента, являющееся эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению

или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и медицинский анамнез пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы.

[0166] Мультиспецифическое антитело по изобретению, как правило, вводят множество раз. Интервалы между отдельными дозами могут являться недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут являться непостоянными, в чем руководствуются измерениями уровней мультиспецифического антитела по изобретению в крови пациента. Альтернативно, мультиспецифическое антитело по изобретению можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, при этом необходимо менее частое введение. Доза и частота варьируются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В основном, гуманизированные антитела демонстрируют большее время полужизни, чем химерные антитела и не принадлежащие человеку антитела. Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом использовании вводят относительно низкую дозу через относительно редкие интервалы в течение длительного периода времени. Некоторых пациентов продолжают подвергать лечению в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом использовании иногда необходима относительно высокая доза с относительно короткими интервалами до снижения или прекращения прогрессирования заболевания и, предпочтительно, до того, как пациент продемонстрирует частичное или полное улучшение симптомов заболевания. Затем пациента можно лечить с помощью профилактического режима.

[0167] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу или фармацевтической композиции для применения в лечении пролиферативного заболевания, в частности злокачественного новообразования, более конкретно - ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования, у нуждающегося в этом индивидуума.

[0168] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, в частности злокачественного новообразования, более конкретно - ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования.

[0169] В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения пролиферативного заболевания, в частности злокачественного новообразования, более конкретно - ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования, у нуждающегося в этом индивидуума.

[0170] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания, в частности злокачественного новообразования, более конкретно - ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования, у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению.

[0171] Термин "индивидуум" включает человека и неявляющихся человеком животных.

[0172] Термин "животные" включают всех позвоночных, например, неявляющихся человеком млекопитающих и немлекопитающих, таких как неявляющиеся человеком приматы, овца, собака, корова, куры, амфибии и пресмыкающиеся. За исключение отмеченных случаев, термины "пациент" или "индивидуум" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.

[0173] В рамках изобретения Термины "лечение", "лечить", "подвергнутый лечению" и т.п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может являться терапевтическим в терминах частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного явления, приписываемого заболеванию, или задержкой прогрессирования заболевания. В рамках изобретения термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, например, человека, и включает: (а) ингибирование заболевания, то есть прекращение его развития; и (b) облегчение заболевания, то есть вызывание регрессирования заболевания.

[0174] Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству средства, которое при введении млекопитающему или другому индивидууму для лечения заболевания является достаточным, чтобы вызвать такое лечение заболевания. "Терапевтически эффективное количество" будет варьироваться в зависимости от средства, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. индивидуума, подвергаемого лечению.

[0175] В одном из вариантов осуществления пролиферативное заболевание является злокачественным новообразованием. Термин "злокачественное новообразование" относится к заболеванию, отличающемуся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровотоки и лимфатическую систему в другие части тела. Термины "опухоль" и "злокачественное новообразование" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, например, оба термина включают солидные и жидкие, например, диффузные или циркулирующие, опухоли. В рамках изобретения термин "злокачественное новообразование" или "опухоль" включает предзлокачественные, а также злокачественные новообразования и опухоли. Термин "злокачественное новообразование" используют в настоящем описании для обозначения широкого спектра опухолей, включая все солидные

злокачественные новообразования и гемобластозы. В частности, злокачественное новообразование является ROR1-экспрессирующим злокачественным новообразованием.

[0176] Неограничивающими примерами ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования являются: лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (CLL/SLL), острый миелолейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), волосатоклеточный лейкоз, фолликулярная лимфома (FL), лимфома из клеток маргинальной зоны (MZL), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), синдром Рихтера (RS), рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак яичников, глиобластома, рак яичка, рак матки, рак надпочечников, меланома, нейробластома, саркома и рак почки.

[0177] Мультиспецифическое антитело или фармацевтическая композиция по изобретению ингибирует рост солидных опухолей, а также опухолей жидких тканей. Мультиспецифическое антитело или фармацевтическая композиция по изобретению также подходит для профилактики метастатического распространения опухолей и роста или развитие микрометастазов у индивидуума, имеющего злокачественное новообразование.

Список последовательностей (мутации обозначены по схеме нумерации АНо; CDR определены по CDR, если конкретно не указано иное)

Таблица 1. Примеры ROR1-связывающих доменов по настоящему изобретению (модификации, при их наличии, указаны полужирным шрифтом; остатки CDR указаны полужирным шрифтом и курсивом).

SEQ ID NO	Область Ab	Последовательность
55-38-D07		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	<i>GFDLSSYAVS</i>
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>IIYPRANTYYASWAKG</i>
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RDRYDSGAYLYTTYFNL</i>
SEQ ID NO: 4	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>RASENIYSGLA</i>
SEQ ID NO: 5	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>RASTLAS</i>
SEQ ID NO: 6	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>QGGYYSSSSTYIA</i>
SEQ ID NO: 7	VH (55-38-D07-sc02) (PRO2060)	QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GFDLSSYAV SWVRQAPGKGLEWI <i>GIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR</i> <i>DRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 8	VH (55-38-D07-sc02) мутации L12R, V103T, L144Q	QSQVVESGGGRVQPGGSLRLSCAVS GFDLSSYAV SWVRQAPGKGLEWI <i>GIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCAR</i> <i>DRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSS</i>
SEQ ID NO: 9	VL (55-38-D07-sc02) (PRO2060)	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASENIYSGLAWYQQKPGKPKLLIY <i>RASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYI</i> <i>AFGTGTKVTVLG</i>
SEQ ID NO: 10	VH (55-38-D07-sc06) мутация G51C (PRO2291)	QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GFDLSSYAV SWVRQAPGKCLEWI <i>GIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR</i>

		<i>DRYDSGAYLYTTYFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 11	VH (55-38-D07-sc06) мутации L12R, G51C, V103T, L144Q	QSQVVESGGGRVQPGGSLRLSCAVS <i>GFDLSSYA</i> VSWVRQAPGKCLEWI <i>GIIYPRANTYYASWAKGR</i> FTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCAR <i>DRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQ</i> VTVSS
SEQ ID NO: 12	VL (55-38-D07-sc06) мутация T141C (PRO2291)	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITC <i>RASENIY</i> SGLAWYQQKPGKPPKLLIY <i>RASTLAS</i> GVSSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QGGYSSSS</i> STYI AFGCGTKVTVLG
55-39-G02		
SEQ ID NO: 13	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо) (присутствует в 55-39-G02-sc02 и 55-39-G02-sc05)	<i>GLSLSRNAMS</i>
SEQ ID NO: 14	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо) (присутствует в 55-39-G02-sc03 и 55-39-G02-sc06)	<i>GIDLSRNAMS</i>
SEQ ID NO: 15	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>IILTSGSTYYASWAKG</i>
SEQ ID NO: 16	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RGIASSSLKSF</i>
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>QASQNVWNNNYLS</i>
SEQ ID NO: 18	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>TASTLAS</i>
SEQ ID NO: 19	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>AGGFSGEIRA</i>
SEQ ID NO: 20	VH (55-39-G02-sc02) (PRO2062)	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS <i>GLSLSRNAMS</i> SWVRQAPGKGLEWI <i>GIILTSGSTYYASWAKGR</i> FTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCVR <i>GIASSSLKSF</i> WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 21	VH (55-39-G02-sc02) мутации L12R, V103T, L144Q	QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAVS GLSLSRNAM SWVRQAPGKGLEWI GIILTSGSTYYASWAKGR FTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCVR GIASSSLKSF WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 22	VL (55-39-G02-sc02) (PRO2062)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQNVWNNNYL SWFQQKPGKPPKLL IV TASTLAS GVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC AGGFSGEIRA FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 23	VH (55-39-G02-sc05) мутация G51C (PRO2292)	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GLSLSRNAM SWVRQAPGKCLEWI GIILTSGSTYYASWAKGR FTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCVR GIASSSLKSF WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 24	VH (55-39-G02-sc05) мутации L12R, G51C, V103T, L144Q	QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAVS GLSLSRNAM SWVRQAPGKCLEWI GIILTSGSTYYASWAKGR FTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCVR GIASSSLKSF WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 25	VL (55-39-G02-sc05) мутация T141C (PRO2292)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQNVWNNNYL SWFQQKPGKPPKLL IV TASTLAS GVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC AGGFSGEIRA FGCGTKVTVLG
SEQ ID NO: 26	VH (55-39-G02-sc03) (PRO2271)	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GIDL SRNAMSWVRQAPGKGLEWI GIILTSGSTYYASWAKGR FTISKSTSTLTLQMNLSLRAEDTAVYFCV RGIA SSSLKSF WGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 27	VL (55-39-G02-sc03) (PRO2271)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQNVWNNNYL SWFQQKPGKPPKLL IV TASTLAS GVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC AGGFSGEIRA FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 28	VH (55-39-G02-sc06) мутация G51C	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GIDL SRNAMSWVRQAPGKCLEWI GIILTSGSTYYASWAKGR FTISKSTSTLTLQMNLSLRAEDTAVYFCV RGIA

		<i>SSSLKSF</i> WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 29	VL (55-39-G02-sc06) мутация T141C	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQNVWNNNYLSWFQ</i> QKPGKPPKLL IVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRA FGCGTKVTVLG

Таблица 2. Примеры CD3-связывающих доменов, используемых в настоящем изобретении (модификации, при их наличии, указаны полужирным шрифтом; остатки CDR указаны полужирным шрифтом и курсивом).

SEQ ID NO	Область Ab	Последовательность
28-21-D09		
SEQ ID NO: 30	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	<i>GFSLSSYDMS</i>
SEQ ID NO: 31	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>ASYASGPTYYSWAKG</i>
SEQ ID NO: 32	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RGGWTGTSHSNI</i>
SEQ ID NO: 33	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>QSSQSVFSNNYLA</i>
SEQ ID NO: 34	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>SASTLAS</i>
SEQ ID NO: 35	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>LGSYACSSADCYV</i>
SEQ ID NO: 36	VH (28-21-D09-sc04) PRO726	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLSSYDMSWVRQ</i> APGKGLAWI GASYASGPTYYSWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCAR <i>GGWTGTSHSNIWGQGLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 37	VH (28-21-D09-sc04) мутации L12R, L144Q	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLSSYDMSWVRQ</i> APGKGLAWI GASYASGPTYYSWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCAR <i>GGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSS</i>
SEQ ID NO: 38	VL (28-21-D09-sc04) PRO726	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QSSQSVFSNNYLAWFQ</i> QKPGQSPKRLI YSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>LGSYACSSADC</i> YVFGTKVTVLG

Таблица 3. Примеры доменов, связывающих сывороточный альбумин человека (hSA), используемых в настоящем изобретении (модификации, при их наличии, указаны полужирным шрифтом; остатки CDR указаны полужирным шрифтом и курсивом).

SEQ ID NO	Область Ab	Последовательность
19-01-H04		
SEQ ID NO: 39	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	<i>GFSLSSNAMG</i>
SEQ ID NO: 40	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>IISVGGFTYYASWAKG</i>
SEQ ID NO: 41	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RDRHGGDSSGAFYL</i>
SEQ ID NO: 42	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>QSSESVYSNNQLS</i>
SEQ ID NO: 43	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>DASDLAS</i>
SEQ ID NO: 44	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>AGGFSSSSDTA</i>
SEQ ID NO: 45	VH (19-01-H04-sc03) (PRO325)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLSSNAMGWVRQAPGK</i> GLEYIG <i>IISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYLMNSLRAEDTATYFC <i>ARD</i> <i>RHGGDSSGAFYLWGQ</i> GLTVTVSS
SEQ ID NO: 46	VL (19-01-H04-sc03) (PRO325)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QSSESVYSNNQLS</i> WYQQKPGQP <i>PKLLIY</i> <i>DASDLASGVPSR</i> FSGSGSGTDFTLTISS <i>LQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAF</i> GGG <i>TKLTVLG</i>
SEQ ID NO: 47	VH (19-01-H04-sc03)мутация G51C (PRO325_Cys)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLSSNAMGWVRQAPGK</i> CLEYIG <i>IISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYLMNSLRAEDTATYFC <i>ARD</i> <i>RHGGDSSGAFYLWGQ</i> GLTVTVSS
SEQ ID NO: 48	VL (19-01-H04-sc03)мутация G141C (PRO325_Cys)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QSSESVYSNNQLS</i> WYQQKPGQP <i>PKLLIY</i> <i>DASDLASGVPSR</i> FSGSGSGTDFTLTISS <i>LQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAF</i> GCG <i>TKLTVLG</i>
23-13-A01		

SEQ ID NO: 49	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	<i>GFSFSSSYWIC</i>
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>CVFTGDGTTYASWAKG</i>
SEQ ID NO: 51	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RPVSVYYYGMDL</i>
SEQ ID NO: 52	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>QASQIISRSA</i>
SEQ ID NO: 53	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>QASKLAS</i>
SEQ ID NO: 54	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>QCTYIDSNFGA</i>
SEQ ID NO: 55	VH (23-13-A01-sc03) (PRO459)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFSSSYWIC</i> WVRQAPGKGLEWV GCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFC ARPVSVYYYGMDLWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 56	VL (23-13-A01-sc03) (PRO459)	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQIISRSA</i> WYQQKPGQPPKLLIY <i>QA</i> <i>SKLAS</i> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <i>QCTYIDSNFGA</i> FGG GTKLTVLG
SEQ ID NO: 57	VH (23-13-A01-sc03)мутация G51C (PRO459_Cys)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFSSSYWIC</i> WVRQAPGKCLEWV GCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFC ARPVSVYYYGMDLWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 58	VL (23-13-A01-sc03)мутация G141C (PRO459_Cys)	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQIISRSA</i> WYQQKPGQPPKLLIY <i>QA</i> <i>SKLAS</i> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <i>QCTYIDSNFGA</i> FGC GTKLTVLG
19-04-A10		
SEQ ID NO: 59	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	<i>GFSLSSYAMN</i>
SEQ ID NO: 60	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	<i>HINAGDIAYYATWAKG</i>
SEQ ID NO: 61	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	<i>RGAGGFSTGPFKL</i>

SEQ ID NO: 62	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо)	<i>QASESINSRLA</i>
SEQ ID NO: 63	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо)	<i>DASDLTS</i>
SEQ ID NO: 64	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо)	<i>QGYGGSSTTT</i>
SEQ ID NO: 65	VH (19-04-A10-sc02) (PRO2155)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLS</i> SYAMNWVRQAPGKGLEWIG <i>HINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYVLQMNSLRAEDTAVYFCAR <i>GAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 66	VH (19-04-A10-sc02) мутации L12R, V103T, L144Q	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLS</i> SYAMNWVRQAPGKGLEWI <i>GHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYVLQMNSLRAEDTATYYCA <i>RGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS</i>
SEQ ID NO: 67	VL (19-04-A10-sc02) (PRO2155)	AFELTQSPSSLSASVGDRVITIC <i>QASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDA</i> <i>SDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGG</i> GTKLTVLG
SEQ ID NO: 68	VH (19-04-A10-sc06) мутация G51C (PRO2317)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLS</i> SYAMNWVRQAPGKCLEWIG <i>HINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYVLQMNSLRAEDTAVYFCAR <i>GAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 69	VH (19-04-A10-sc06) мутации L12R, G51C, V103T, L144Q	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLS</i> SYAMNWVRQAPGKCLEWIG <i>GHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYVLQMNSLRAEDTATYFCA <i>RGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS</i>
SEQ ID NO: 70	VL (19-04-A10-sc06) мутация G141C (PRO2317)	AFELTQSPSSLSASVGDRVITIC <i>QASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDA</i> <i>SDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGC</i> GTKLTVLG

Таблица 4. Другие последовательности, относящиеся к настоящему изобретению.

SEQ ID NO	Область Ab	Последовательность
------------------	-------------------	---------------------------

SEQ ID NO: 71	VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYYPGWVRQAPGKGLE WIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAV YYCARSAWYSGWGGDLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 72	VH1a	QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCKASGIDFNSNYIMCWVRQAPGQGLE WMGCIYVGSHTVNTYYANWAKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCATSGSSVLYFKFWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 73	VH1b	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGIDFNSNYIMCWVRQAPGQGLE WMGCIYVGSHTVNTYYANWAKGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAV YYCATSGSSVLYFKFWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 74	VH4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSNSYIWICWIRQPPGKGLEWI GCTFVGSSTSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 75	Vkappa1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIY RSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSSYGNVYGDFG TGTKVTVLG
SEQ ID NO: 76	FR4 на основе Vλ зародышевой линии (Sk17)	FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 77	FR4 на основе Vλ зародышевой линии (Sk12)	FGGGTKLTVLG
SEQ ID NO: 78	FR4 на основе Vλ зародышевой линии	FGGGTQLIILG
SEQ ID NO: 79	FR4 на основе Vλ зародышевой линии	FGEGTELTVLG
SEQ ID NO: 80	FR4 на основе Vλ зародышевой линии	FGSGTKVTVLG

SEQ ID NO: 81	FR4 на основе Vλ зародышевой линии	FGGGTQLTVLG
SEQ ID NO: 82	FR4 на основе Vλ зародышевой линии	FGGGTQLTALG
SEQ ID NO: 83	FR4 на основе Vλ зародышевой линии_G141C	FGCGTKVTVLG
SEQ ID NO: 84	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 85	Линкер	GGGS
SEQ ID NO: 86	Линкер	GGGGSGGGGS

Таблица 5. Примеры мультиспецифических антител по настоящему изобретению (модификации и линкеры указаны полужирным шрифтом).

SEQ ID NO	Формат Ab	Последовательность
PRO2286		
SEQ ID NO: 87	scMATCH3	DVVM TQSPSSLSASVGDRV TITCQASQIISRS AWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAT YFCARGGWTGTSHSNIWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LGSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVR QAPGKCLEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYY YGMDLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRV TITCQASQNVWNNNYLSWFQQ KPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGL EWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGLTV

		TVSS
PRO2287		
SEQ ID NO: 88	scMATCH3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDT ATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVITTCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGW VRQAPGKCLEYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDS SGAFYLVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNVWNNNLSWFQ QKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGKVTVI GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKG LEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGT LVTVSS
PRO2507		
SEQ ID NO: 89	scMATCH3	AFELTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATY FCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDVQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIYSGLAWYQQKPGKPP

		<p>KLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIG IYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQ GTLVTVSS</p>
PRO2508		
SEQ ID NO: 90	scMATCH3	<p>AFELTQSPSSLASVGDRVTITCQASESINRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATY FCARGGWTGTSHSNIWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTI TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYASSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSDVQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPP KLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIG IYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQ GTLVTVSS</p>
PRO2509		
SEQ ID NO: 91	scMATCH3	<p>AFELTQSPSSLASVGDRVTITCQASESINRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATY FCARGGWTGTSHSNIWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTI TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYASSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL</p>

		<p>GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPG KPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGKTVIGGGG GSGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIG IILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSLKSFWGQGTLVTVSS</p>
PRO2510		
SEQ ID NO: 92	scMATCH3	<p>AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAY FCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYASSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPG KPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGG GSGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIG IILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSLKSFWGQGTLVTVSS</p>
PRO2557		
SEQ ID NO: 93	scMATCH3	<p>AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAY FCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI</p>

		TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNNYLSWFQQKPG KPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIG IILTSYSTYYASWAKGRFTISKSTTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS
PRO2596		
SEQ ID NO: 94	scMATCH3	AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATY FCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNNYLSWFQQKPG KPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIG IILTSYSTYYASWAKGRFTISKSTTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS
PRO2589		
SEQ ID NO: 95	MATCH4 (цепь_1)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS

		KNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSFAFELTQ SPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNN YLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYV FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 96	MATCH4 (цепь_2)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSQSSQSVVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGWTGTSHSNIWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGLTVTVSS
PRO2590		
SEQ ID NO: 97	MATCH4 (цепь_1)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSQSSQSVVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSFAFELTQ SPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNN YLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYV FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 98	MATCH4	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD

	(цепь_2)	FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIHYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS
PRO2591		
SEQ ID NO: 99	MATCH4 (цепь_1)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKSTTT LDLQMNLSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASVGD RVTITCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQK GQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTV LG
SEQ ID NO: 100	MATCH4 (цепь_2)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKSTTT LDLQMNLSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS

		LRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS
PRO2592		
SEQ ID NO: 101	MATCH4 (цепь_1)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKSTTT LDLQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASVGD RVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKP GQSPKRLIYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTV LG
SEQ ID NO: 102	MATCH4 (цепь_2)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKSTTT LDLQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNS LRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGLVTVSS
PRO2658		
SEQ ID NO: 103	MATCH4 (цепь_1)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVIRGIASSSLKSFWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV

		GDRVTITCQASESINRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQ KPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVT VLG
SEQ ID NO: 104	MATCH4 (цепь_2)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQTLVTVSS
PRO2659		
SEQ ID NO: 105	MATCH4 (цепь_1)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGLVQPGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQSPSSLSASV GDRVTITCQASESINRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQ KPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVT VLG
SEQ ID NO: 106	MATCH4 (цепь_2)	AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE

		SGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQP GSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS
PRO2667		
SEQ ID NO: 107	scMATCH3	AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATY FCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSDVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPP KLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYSSSSTYIAFGTGKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVESGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKLEWIG IYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQ GTQVTVSS
PRO2668		
SEQ ID NO: 108	scMATCH3	AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATY

		<p>FCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVIGGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQ APGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPF KLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSAQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPG KPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVIGGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIG IILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCVIRGIASSSLKSFWGQGTQVTVSS</p>
PRO2669		
SEQ ID NO: 109	MATCH4 (цепь_1)	<p>DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVES GGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIPRANTYYASWAKGRFTISKDNK NTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSAFELTQS PSSLSASVGDRVTITCQASEINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQGYGGSSTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCY VFGTGTKVTVLG</p>
SEQ ID NO: 110	MATCH4 (цепь_2)	<p>DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN NSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLV</p>

		ESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN NSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS
PRO2670		
SEQ ID NO: 111	MATCH4 (цепь_1)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSFAFELT QSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQGYGGSSTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYASSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCY VFGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 112	MATCH4 (цепь_2)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN NSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLV ESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN NSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS
PRO2677		
SEQ ID NO: 113	MATCH4 (цепь_1)	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNS

		KNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSFAFELT QSPSSLASVGDRVTITCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCY VFGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 114	MATCH4 (цепь_2)	AQQLTQSPSSLASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLQMNSLRAEDTATYFCVRGIASSSLKSFWGQQLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRV QPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYL QMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGRVQ PGGSLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS
PRO2678		
SEQ ID NO: 115	MATCH4 (цепь_1)	DVQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQGGYSSSSTYIAFGTGTKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQVVE SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIPRANTYYASWAKGRFTISKDNS KNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSFAFELT QSPSSLASVGDRVTITCQASESINSLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVIGGGSGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCY VFGTGTKVTVLG
SEQ ID NO:	MATCH4	AQQLTQSPSSLASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGS

116	(цепь_2)	<p>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGKVTVIGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVE</p> <p>SGGGRVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKSTST</p> <p>LDLQMNSLRAEDTATYFCVRGIASSSLKSFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPG</p> <p>GSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQM</p> <p>NSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPGG</p> <p>SLRLSCAASGFSLSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMN</p> <p>SLRAEDTATYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTQVTVSS</p>
-----	----------	---

Таблица 6. Последовательность внеклеточного домена ROR1 человека (остатки 30-407), включая N-концевой сигнальный пептид (остатки 1-29), в соответствии с UniProtKB - Q01973 (внеклеточная часть указана курсивом; остатки Ig-подобного домена, то есть остатки 42-147, указаны полужирным шрифтом и курсивом).

SEQ NO	ID	Последовательность
SEQ NO: 117	ID	<p>MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITSLGQTAELHCKVS</p> <p><i>GNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEY</i></p> <p><i>EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRD</i></p> <p><i>ECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVVDYRGTVSVTKSGRQCQP</i></p> <p><i>WNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY</i></p>

[0178] На всем протяжении настоящей заявки, если есть расхождения между текстом описания (например, таблицами 1-6) и списком последовательностей, текст описания обладает приоритетом.

[0179] Считают, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. и наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также можно представлять отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к настоящему изобретению, конкретно включены в настоящее изобретение и представлены в настоящем описании так, как если бы каждая комбинация была отдельно и конкретно описана. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также конкретно входят в настоящее изобретение и представлены в настоящем описании так, как если бы каждая такая подкомбинация была отдельно и конкретно представлена в настоящем описании.

[0180] Настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение к представленным в настоящем описании будут очевидны специалистам в этой области из изложенного выше описания. Такие модификации предназначены для включения в объем формулы изобретения.

[0181] В той степени, в которой это разрешено соответствующим патентным законодательством, все патенты, заявки, публикации, способы тестирования, литература и другие материалы, процитированные в настоящем описании, включены, таким образом, в него в качестве ссылки.

[0182] Следующие примеры служат для иллюстрирования описанного выше изобретения, однако, не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом. С помощью других тестовых моделей, известных специалисту в этой области, также можно определять полезный эффект описываемого в заявке изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение и тестирование молекул против ROR1:

Цель проекта

[0183] Целью проекта являлось получение фрагментов гуманизованного моноклонального антитела, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 человека. Дополнительной целью являлась идентификация фрагментов антител против ROR1, являющихся достаточно активными и стабильными для включения в форматы мультиспецифических антител.

1.1. Иммунизация

[0184] Девять кроликов иммунизировали внеклеточным доменом (ECD) ROR1 человека. Шесть кроликов иммунизировали по стандартному протоколу Numab, состоящему из четырех инъекций антигена в течение 70 дней, и трех дополнительных

кроликов иммунизировали, следуя расширенному протоколу, состоящему из той же исходной схемы, что и стандартный протокол, с конечной инъекции антиген за четыре дня до окончания протокола в день 112.

1.2. Сортировка и идентификация совпадений

[0185] 3740 отдельных В-клеток, полученных из шести кроликов, иммунизированных по стандартному протоколу иммунизации Numab, сортировали посредством FACS с использованием внеклеточного домена ROR1. Отдельные В-клетки культивировали и собирали супернатант В-клеток, содержащий интересующие секретируемые антитела, за период четырех недель. Из 3740 сортированных В-клеток, 993 клон демонстрировали связывание с рекомбинантным ROR1 человека по результатам ELISA. Затем положительные клоны тестировали на способность связываться с ROR1-экспрессирующими клетками, и 627 клонов демонстрировали связывание со злокачественными клетками, экспрессирующими высокие уровни ROR1 (MDA-MB-231), из которых 99 клонов демонстрировали аффинность к ECD ROR1 человека ниже 800 пМ. Выявляли последовательности тяжелых и легких цепей этих клонов и 15 ROR1-связывающих клонов с лучшими аффинностями связывания, измеренными посредством SPR, выбирали для продуцирования в виде рекомбинантных IgG кролика.

1.3. Производство рекомбинантного IgG кролика

[0186] После селекции клонов для подтверждения совпадений антитела кролика клонировали, экспрессировали и очищали для дальнейшей характеристики. Клонирование соответствующих переменных доменов легкой и тяжелой цепи приводило к лигированию *in vitro* фрагментов ДНК в подходящий экспрессирующий вектор млекопитающего (pFUSE, Invivogen). Экспрессирующие векторы для тяжелых и легких цепей антитела кролика трансфицировали в суспензионную линию клеток млекопитающего (CHO-S) для тарнзиторной гетерологичной экспрессии (в масштабе 50 мл, набор для экспрессии Mirus CHOgro). Затем секретируемые IgG кролика аффинно очищали (аффинная очистка с протеином А), подвергали замене буфера на PBS при pH 7,4 и анализировали конечные продукты посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ с SDS, данные не представлены), поглощения УФ при 280 нм и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ) для подтверждения идентичности, содержания и чистоты. Из 15 выбранных IgG кролика успешно продуцировали 13.

1.4. Подтверждение совпадений рекомбинантного IgG кролика (rIgG)

[0187] 13 успешно продуцированных rIgG оценивали на аффинность связывания с ROR1-экспрессирующими клетками посредством CELISA и с рекомбинантным ROR1 посредством SPR. Кроме того, связывающую область rIgG на ROR1 определяли посредством анализа связывания IgG кролика с тремя химерными вариантами ROR1/ROR2.

Связывание с ROR1-экспрессирующими клетками по результатам CELISA

[0188] Связывание с ROR1-экспрессирующими клетками оценивали с использованием клеток MDA-MB-231 (ATCC, кат. № HTB-26, клетки аденокарциномы

молочной железы человека, экспрессирующие высокие уровни ROR1 человека) и MCF-7 (ATCC, кат. № HTB-22, клетки рака молочной железы человека, неэкспрессирующие ROR1 человека). 40000 клеток распределяли на обработанные плоскодонные 96-луночные планшеты для культивирования ткани. На следующий день планшеты промывали три раза в режиме перелива с помощью 450 мкл промывочного буфера (PBS, 0,2% BSA) на лунку, добавляли 50 мкл каждой точки серийных разведений каждого тестируемого IgG кролика, а также референсного антитела против ROR1 PRO1842 (антитела IgG человека, содержащего последовательности VH/VL SEQ-ID NO: 129 и 130, как описано в патентной заявке США №№ 2017/0306018 A1) и планшеты инкубировали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре (RT) при осторожном встряхивании. После трех промывок 450 мкл промывочного буфера в соответствующие лунки добавляли 50 мкл HRP-конъюгированных антител козы против IgG кролика или кролика против IgG человека. Через 1 ч. инкубации при RT на коническом миксере планшеты промывали три раза 450 мкл промывочного буфера на лунку перед добавлением 50 мкл ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина, KPL, кат. № 53-00-00). Через 10 минут проявку ферментативной реакции останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl на лунку и считывали планшет при 450 нм с использованием 690 нм в качестве референсной длины волны. Для рекомбинантной продукции PRO1842 экспрессирующие плазмиды млекопитающих (pcDNA3.1, клетки-хозяева: CHO-S) заказывали в Gene Universal (Newark DE, United States). Экспрессию и очистку PRO1842 осуществляли аналогичным образом, как описано выше в разделе 1.3, и достигали достаточного количества материала и чистоты (содержание мономера >98% по результатам SE-ВЭЖХ) для предполагаемого использования.

[0189] Одиннадцать клонов демонстрировали связывание с ROR1-экспрессирующими клетками, и восемь из этих клонов связывались с ROR1 с EC_{50} , схожей или лучше, чем референсное антитело PRO1842 (см. таблицу 6).

Аффинности связывания по результатам SPR

[0190] Кинетику связывания (включая аффинность) IgG кролика к рекомбинантному белку ROR1 человека (His-метка, Acro Biosystems) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства Mass2 (Sierra Sensors, Bruker). Молекулы IgG кролика захватывали на специфических пятнах с помощью антитела против IgG кролика (антитела против IgG-Fc кролика, Bethyl), ковалентно иммобилизованного на поверхности карбоксилметилованного декстрана (сенсорный чип HCA; Sierra Sensors, Bruker), и серию титров рекомбинантного белка ROR1 человека инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита инъекция, каждое пятно на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин-HCl, pH 1,5), а затем снова захватывали новый IgG кролика. Кинетику связывания с ROR1 человека измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с десятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,176 до 90 нМ, разведенными в подвижном буфере (забуференном HEPES физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Bioconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D)

вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Sierra Sensors (анализатор Sierra, Sierra Sensors, Bruker) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество совпадений подвергали мониторингу с учетом относительного χ^2 . Уровень связывания вычисляли как максимальную достигнутую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{\max} .

[0191] Аффинность к рекомбинантному ROR1 определяли для одиннадцати IgG кролика. Не наблюдали связывания для одного клона, и лучшая измеренная аффинность связывания составляла 1,06 нМ. Результаты обобщены в таблице 7. Референсное антитело против ROR1 PRO1776 (антитело человека против IgG4, содержащее последовательности VH/VL SEQ-ID NO: 5 и 7, как описано в патентной заявке № WO 2014/031174) также измеряли в схожих условиях. Для рекомбинантной продукции PRO1776, экспрессирующих плазмид млекопитающего (pcDNA3.1, клетки-хозяева: CHO-S) заказывали в Gene Universal (Newark DE, United States). Экспрессию и очистку PRO1776 осуществляли аналогичным образом, как описано выше в разделе 1.3, и достигали достаточного количества материала и чистоты (содержание мономера >98% по результатам SE-ВЭЖХ) для предполагаемого использования.

Идентификация связывающей IgG кролика (rIgG) области на ROR1

[0192] Для определения связывающей области rIgG на ROR1 степень связывания с клетками HEK293T, транзитивно трансфицированными с использованием трех химерных вариантов ROR1/ROR2, оценивали посредством CELISA. Варианты ROR1/ROR2 получали посредством замены каждого из трех доменов ROR1, то есть Ig-подобного домена ROR1 (область 1), домена Frizzled ROR1 (область 2) и домена Kringle ROR1 (область 3), соответствующей областью ROR2. Для исключения потенциальных ROR2-связывающих средств, связывание с ROR2 сначала оценивали посредством ELISA; в этом анализе не идентифицировали ROR2-связывающие средства.

[0193] Затем планшеты покрывали в количестве 25000 клеток на лунку на плоскодонных, обработанных поли-D-лизином 96-луночных планшетах. На следующий день клетки трансфицировали с помощью соответствующих конструкций и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через двадцать четыре часа клетки промывали 450 мкл промывочного буфера (PBS, 0,2% BSA), добавляли образцы (10 мкг/мл rIgG) и инкубировали в течение 1,5 ч. при RT при осторожном встряхивании. После 3 промывок 450 мкл промывочного буфера в каждую лунку добавляли 50 мкл HRP-конъюгированного антитела козы против IgG кролика. Через 1 ч. инкубации при RT на коническом миксере планшеты промывали три раза 450 мкл промывочного буфера на лунку перед добавлением 50 мкл ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина, KPL, кат. № 53-00-00). Через 10 минут проявку ферментативной реакции прекращали посредством добавления 50 мкл 1 М HCl на лунку и считывали планшет при 450 нм с использованием 690 нм в качестве референсной длины волны. Уровни связывания rIgG вычисляли относительно связывания IgG кролика с wtROR1. Очевидное снижение уровня связывания rIgG с конкретным вариантом по сравнению с белком wtROR1 будет свидетельствовать о локализации эпитопа rIgG в сегменте ROR1

человека, замененном соответствующей последовательностью ROR2.

[0194] Четко определенную связывающую область идентифицировали для 12 IgG кролика. Девять gIgG связались с областью 1 (Ig-подобный домен ROR1), и три антитела связались с областью 2 (домен Frizzled ROR1). Ни один gIgG не связывался с областью 3 (домен Kringle ROR1). Результаты обобщены в таблице 7.

Таблица 7: Характеризация связывания 15 IgG кролика по результатам SPR и CELISA

ID клона	Аффинность к hROR1 по результатам SPR			Связывание с ROR1-экспрессирующими клетками (MDA-MB-231)		Связывающая область
	k_a (1/Mc)	k_d (1/s)	K_D (M)	EC_{50} (нМ)	Отн. EC_{50} (EC_{50} , референс/ EC_{50} , образец)	
55-06-E06	2,68E+05	3,50E-03	1,31E-08	0,04	1,92	1
55-18-H06	Не получено					
55-19-D06	1,37E+05	3,61E-04	2,63E-09	0,05	1,72	1
55-21-E10	2,45E+05	2,87E-04	1,17E-09	0,09	1,06	1
55-29-G11	Не измерено			2,17	0,04	2
55-32-E10	Не измерено			NB	NA	2
55-33-A06	2,05E+05	4,12E-04	2,01E-09	0,05	2,49	1
55-35-D08	6,82E+04	7,34E-04	1,08E-08	1,70	0,07	2
55-38-D07	2,21E+05	2,97E-04	1,34E-09	0,06	1,94	1
55-38-F04	NB	NB	NB	NB	NA	NB
55-39-A08	3,55E+04	3,75E-05	1,06E-09	0,31	0,29	1
55-39-G02	2,29E+05	3,37E-04	1,47E-09	0,06	1,42	1
55-40-E06	Не получено					
55-42-D02	6,70E+04	4,32E-04	6,44E-09	0,08	1,01	1
55-42-E05	1,82E+05	5,51E-04	3,03E-09	0,03	2,48	1
PRO1776	3,06E+05	1,73E-02	5,65E-08	NA	NA	1
PRO1842	Не измерено			12,38	1	не оценено

NA: Не применимо

NB: Нет связывания

PRO1776: референсное антитело (антитело IgG4 человека, содержащее последовательности VH/VL SEQ-ID NO: 5 и 7, как описано в патентной заявке № WO 2014/031174)

PRO1842: референсное антитело (антитело IgG человека, содержащее последовательности VH/VL SEQ-ID NO: 129 и 130, как описано в патентной заявке США № 2017/0306018 A1)

[0195] Восемь клонов демонстрировали аффинность связывания с ROR1-экспрессирующими клетками MDA-MB-231, превосходящую или сравнимую с референсным антителом против ROR1 PRO1842. Из этих восьми клонов, семь лучших клонов выбирали для экспрессии в виде двух-два версии гуманизованных одноцепочечных Fv на каркасе Numab.

1.5. Получение ScFv

Получение ScFv

[0196] Целью гуманизации последовательности является снижение риска иммуногенности для интересующих молекул и стабилизация переменного домена антитела (Fv-фрагмента), чтобы иметь возможность использовать его в качестве структурного элемента для сборки мультиспецифических форматов. Таким образом, гуманизация включает перенос важных остатков из последовательностей определяющей комплементарности области (CDR) донора (кролика) на акцепторный каркас человека для повышения "человекоподобности" и улучшения стабильности без значимого влияния на функциональность.

[0197] Для получения основного scFV-домена против ROR1 семь клонов моноклонального антитела кролика выбирали, как показано в таблице 7. Гуманизация этих клонов включала перенос CDR кролика на собственные акцепторные каркасы Numab для переменных доменов человека. В ходе этого аминокислотные последовательности шести областей CDR охарактеризовывали с использованием определений CDR по Numab (таблица 8) и пересаживали на собственный и высокостабильный, полностью человеческий VH3/Vk1-лямбда-кэпированный акцепторный каркас Numab; эти конструкции известны как "пересаженные CDR".

Таблица 8: Определение CDR по Numab относительно нумерации AHo (Honegger) и Kabat

Область	Нумерация AHo	Нумерация Kabat
CDR1-VL	24-42	24-34
CDR2-VL	58-72	50-56
CDR3-VL	107-138	89-97
CDR1-VH	27-42	26-35A/35B/...
CDR2-VH	57-76	50-65
CDR3-VH	108-138	94-102

[0198] Исключительная пересадка CDR кролика на акцепторный каркас человека является наиболее основной стратегией пересадки, в настоящем описании обозначаемой как "трансплантат CDR". Помимо пересадки CDR, конструировали дополнительный пересаженный вариант, содержащий определенные паттерны каркасных остатков кролика, в настоящем описании обозначаемый как "полный трансплантат". Подробности этих вариантов пересадки приведены ниже:

Трансплантат CDR: Пересадка CDR кролика на акцепторный каркас Numab с использованием определения CDR по Numab. Без обратных мутаций донорных каркасных остатков.

Полный трансплантат: Максимальный трансплантат, содержащий коровье остатки донорного Fv, остатки области контакта VL/VH донора, а также донорные каркасные остатки, потенциально взаимодействующие с антигеном.

[0199] В таблице 9 обобщены трансплантаты CDR и полные трансплантаты гуманизированных доменов ROR1. Каркасные остатки кролика, пересаженные на каркас человека, приведены для доменов VL и VH отдельно (с использованием нумерация АНО).

[0200] Экспрессирующие плазмиды млекопитающих (pcDNA3.1, клетки-хозяева: CHO-S) гуманизированных конструкций scFv заказывали в количестве 1 мг в Gene Universal. Плазмиды использовали для транзитной трансфекции клеток CHO-S, как описано ниже.

Производство ScFv

[0201] Экспрессию конструкций scFv млекопитающих осуществляли в клетках CHO-S с использованием набора для транзитной трансфекции CHOgro (Mirus). Культуры собирали посредством центрифугирования с последующей фильтрацией после максимум 7 дней экспрессии при 37°C (или когда жизнеспособность клеток достигала <70%). Белки очищали из осветленных супернатантов культур с помощью аффинной хроматографии с протеином L. За исключением полученных из клона 55-06-E06 scFv, все молекулы демонстрировали фракции с содержанием мономера >95% после захвата, что оценивали посредством анализа SE-ВЭЖХ. Все молекулы напрямую повторно забуферивали до 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4 посредством диализа. CDR-трансплантат клона 55-42-E05 (PRO2065) демонстрировал низкий титр экспрессии, и, таким образом, его нельзя было использовать далее. Для контроля качества производимого материала использовали стандартные аналитические способы, такие как SE-ВЭЖХ, UV₂₈₀ и электрофорез в ПААГ с SDS. Производство гуманизированных молекул scFv против ROR1 обобщено в таблице 10.

[0202] Т.к. один scFv не могли экспрессировать (55-42-E05-sc01/PRO2065), только 13 из 14 scFv подвергали последующей фармакодинамической характеристике.

Таблица 9: Обзор трансплантатов CDR и полных трансплантатов гуманизированных доменов против ROR1; обратные мутации донорного каркаса указаны отдельно для доменов VL и VH.

ID PRO	описание	Каркас	Стратегия пересадки	Пересаженные каркасные остатки кролика, VL	Пересаженные каркасные остатки кролика, VH
PRO2055	55-06-E06-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2056	55-06-E06-sc02	Vk1/VH3	Полная	D1A, I2Q, M4L, A51P	E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F
PRO2057	55-33-A06-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2058	55-33-A06-sc02	Vk1/VH3	Полная	D1A, A51P, F89Y	E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F
PRO2059	55-38-D07-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2060	55-38-D07-sc02	Vk1/VH3	Полная	I2V, A51P	E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F
PRO2061	55-39-G02-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2062	55-39-G02-sc02	Vk1/VH3	Полная	D1A, I2Q, M4L, Y44F, A51P, Y57V	E1Q, V2S, A25V, R82K, Y105F, A107V
PRO2063	55-19-D06-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2064	55-19-D06-sc02	Vk1/VH3	Полная	D1A, I2Q, M4L, Y44F, A51P, P52L, L54V	E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F
PRO2065	55-42-E05-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2066	55-42-E05-sc02	Vk1/VH3	Полная	D1A, I2Q, M4L, A51P	E1Q, V2S, L4V, A25V, W54Y, R82K, Y105F
PRO2067	55-21-E10-sc01	Vk1/VH3	CDR	-	-
PRO2068	55-21-E10-sc02	Vk1/VH3	Полная	A51P, L54Q, G82R,	E1Q, V2S, G56A, R82K, Y105F

Таблица 10: Производство ScFv с гуманизированными трансплантатами CDR и полными трансплантатами из 7 выбранных клонов кролика

ID белка	Описание	Титр после захвата [мг/л]	Конечный титр [мг/л экспрессионной среды]	Чистота по результатам SE-ВЭЖХ [% мономера]
PRO2055	55-06-E06-sc01	33,5	18,8	90,6
PRO2056	55-06-E06-sc02	9,5	7,1	92,4
PRO2057	55-33-A06-sc01	33,5	32,0	99,2
PRO2058	55-33-A06-sc02	37,0	34,9	99,4
PRO2059	55-38-D07-sc01	44,0	43,6	94,2
PRO2060	55-38-D07-sc02	34,0	30,6	94,3
PRO2061	55-39-G02-sc01	3,5	3,1	95,5
PRO2062	55-39-G02-sc02	13,0	11,0	99,8
PRO2063	55-19-D06-sc01	13,5	11,3	99,5
PRO2064	55-21-E10-sc01	50,0	14,3	99,8
PRO2066	55-42-E05-sc02	8,5	8,0	98,5
PRO2067	55-19-D06-sc02	13,0	53,6	99,1
PRO2068	55-21-E10-sc02	18,0	17,5	98,2

1.6. Характеризация ScFv

Связывание клеток с ROR1-экспрессирующими клетками MDA-MB-231 по результатам проточной цитометрии

[0203] Собирали клетки MDA-MB-231 (ATCC, кат. № HTB-26, клетки аденокарциномы молочной железы человека, экспрессирующие высокие уровни ROR1 человека) и MCF-7 (ATCC, кат. № HTB-22, клетки рака молочной железы человека, неэкспрессирующие ROR1 человека) и определяли количество клеток. Суспензии клеток центрифугировали в течение 5 мин при 400×g и 100 мкл суспензий клеток (50000 клеток), разведенных в PBS-EB (1-кратный DPBS, 2% FCS Н.И., 2 mM ЭДТА) добавляли в обозначенные лунки в несвязывающий 96-луночный планшет. После трех стадий промывки PBS-EB клетки центрифугировали и аспирировали промывочный буфер. Подготавливали 3-кратные серийные разведения scFv и референсного Fab-фрагмента против ROR1 PRO2213 (Fab-фрагмента человека, содержащего последовательности VH/VL SEQ-ID NO: 129 и 130, как описано в патентной заявке США № 2017/0306018 A1), начиная с концентрации 39 нМ (scFv) или 63 нМ (PRO2213), а затем добавляли на планшеты с клетками. После инкубации при 4°C в течение 1 ч. планшеты промывали три раза с использованием 100 мкл PBS-EB. Клетки, инкубированные с scFv, ресуспендировали с 100 мкл специфического детекторного антитела для каркаса Numab (PRO2268, IgG кролика) и

инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После стадии промывки PRO2268 затем определяли посредством добавления антитела против IgG кролика, меченого APC, в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч. при 4°C. Клетки, инкубированные с референсным Fab-фрагментом PRO2213, ресуспендировали с 100 мкл Alexa Fluor 647-конъюгированным антителом козы против F(ab')₂ человека (Jackson Immuno Research, кат. № 109-606-097) в концентрации 2,8 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч. при 4°C. Затем клетки снова промывали три раза с использованием 100 мкл PBS-EB на лунку. Клеточные осадки ресуспендировали с 50 мкл PBS-EB и анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte 2060. Интенсивность флуоресценции по каналу APC регистрировали для каждого образца и вычисляли геометрическое среднее интенсивности флуоресценции (MFI). Данные анализировали с одним референсом (вычитали из интенсивности флуоресценции, обнаруженной на клетках, инкубированных только с детекторными реагентами), и полученные кривые концентрация-ответ аппроксимировали с использованием аппроксимации 4-PL (программное обеспечение GraphPad Prism). PRO2213 получали посредством расщепления папаином IgG человека PRO1842. PRO2213 можно получать в достаточном количестве и чистотой (содержание мономера >98% по результатам SE-ВЭЖХ) для предполагаемого использования.

[0204] Оценивали кажущуюся аффинность связывания с ROR1 человека на поверхности клетки, и четыре scFv демонстрировали EC₅₀ для связывания с экспрессирующими ROR1 человека клетками не более, чем в три раза ниже референсного Fab-фрагмента PRO2213. Два scFv не демонстрировали связывания с клетками, экспрессирующими ROR1 человека (таблица 11). Для тестирования неспецифического связывания все scFv тестировали на связывание с отрицательными по ROR1 человека клетками MCF-7 посредством проточной цитометрии, и ни один из тестируемых scFv не демонстрировал связывание с клетками MCF-7. В случае scFv против ROR1 PRO2060 и PRO2062, кажущуюся аффинность связывания с ROR1 человека на плазматической мембране оценивали в трех и двух независимых экспериментах по проточной цитометрии, соответственно. Значения средней EC₅₀ и средней относительной EC₅₀, полученные в этих экспериментах для PRO2060 и PRO2062, также приведены в таблице 11. Оба scFv демонстрировали специфическое связывание с положительными по ROR1 человека клетками MDA-MB-231, в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (см. фигуру 1). По сравнению с референсным Fab-фрагментом PRO2213, PRO2060 демонстрировал приблизительно в три раза более низкую кажущуюся аффинность связывания, в то время как PRO2062 демонстрировал в приблизительно три раза более высокую кажущуюся аффинность связывания.

Таблица 11: Кажущаяся аффинность связывания scFv против ROR1 с ROR1 человека на плазматической мембране, экспрессирующимся на клетках MDA-MB-231, по результатам проточной цитометрии.

ID белка	Описание клона	EC ₅₀ [нМ]	Отн. EC ₅₀ (EC ₅₀ , PRO2213/EC ₅₀ , scFv)	Отн. максимальное связывание
----------	----------------	--------------------------	---	---------------------------------

				(MFI _{scFv} /MFI _{PRO2213})
PRO2055	55-06-E06-sc01	2,26	0,29	0,49
PRO2056	55-06-E06-sc02	3,13	0,21	0,31
PRO2057	55-33-A06-sc01	Нет связывания		
PRO2058	55-33-A06-sc02	Невычисляемое		0,26
PRO2059	55-38-D07-sc01	3,5	0,33	0,54
PRO2061	55-39-G02-sc01	25,63	0,02	0,13
PRO2063	55-19-D06-sc01	30,8	0,02	0,13
PRO2064	55-21-E10-sc01	16,4	0,04	0,41
PRO2066	55-42-E05-sc02	0,59	1,21	0,89
PRO2067	55-19-D06-sc02	Нет связывания		
PRO2068	55-21-E10-sc02	19,75	0,05	0,08
PRO2060	55-38-D07-sc02	2,93	0,33	1,00
PRO2062	55-39-G02-sc02	0,26	2,77	0,85

[0205] PRO2060 и PRO2062 измеряли в трех и двух независимых экспериментах, соответственно, и вычисляли значения средней EC₅₀, средней относительной EC₅₀, среднего относительного максимального связывания. PRO2213 использовали в качестве референсного антитела против ROR1.

Аффинность связывания по результатам SPR

[0206] Кинетика связывания (включая аффинность) scFv с рекомбинантным белком ROR1 человека (Fc-метка, Астро Biosystems) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Рекомбинантные молекулы ROR1 человека ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и серию титров каждого scFv инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0) и инъецировали новую концентрацию scFv. Кинетику связывания с ROR1 человека измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с девятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,005 до 30 нМ, разводили в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Biosconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 и U-критерия, являющихся показателями качества аппроксимации кривых. Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0207] Все 13 scFv оценивали по их аффинности связывания с ROR1-экспрессирующими клетками и рекомбинантным hROR1. Данные коррелировали и приведены в таблице 12.

[0208] Аффинность к hROR1 определяли для 8 scFv. Аффинности находились в диапазоне от 160 нМ до 0,098 нМ. Три scFv демонстрировали лучшую аффинность, чем референсный Fab-фрагмент PRO2213. Для трех scFv аффинность нельзя было определить по техническим причинам, и не наблюдали связывания для 2 scFv (таблица 12).

Таблица 12: Обобщение измерений аффинности к hROR1 для выбранных scFv.

ID белка	Описание	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
PRO2055	55-06-E06-sc01		Невычисляемое	
PRO2056	55-06-E06-sc02		Невычисляемое	
PRO2057	55-33-A06-sc01		Нет связывающего средства	
PRO2058	55-33-A06-sc02	4,28E+05	9,37E-03	2,19E-08
PRO2059	55-38-D07-sc01	2,18E+05	4,09E-04	1,88E-09
PRO2060	55-38-D07-sc02	2,50E+05	9,79E-05	4,16E-10
PRO2061	55-39-G02-sc01	1,24E+06	2,00E-01	1,61E-07
PRO2062	55-39-G02-sc02	4,45E+06	4,55E-04	1,03E-10
PRO2063	55-19-D06-sc01	1,83E+07	1,66E-01	9,07E-09
PRO2064	55-21-E10-sc01		Невычисляемое	
PRO2066	55-42-E05-sc02	3,39E+06	7,99E-04	2,36E-10
PRO2067	55-19-D06-sc02		Невычисляемое	
PRO2068	55-21-E10-sc02	7,16E+05	8,68E-02	1,21E-07
PRO2213	n/a	6,61E+05	3,95E-04	5,98E-10

[0209] Эти домены, демонстрирующие отсутствие связывания (по результатам SPR и анализа связывания клеток) или промежуточные данные исключали из дальнейшего анализа. Четыре scFv, полученные из трех разных клонов, демонстрирующих лучшее связывание три с экспрессирующими ROR1 человека клетками, а также наибольшие аффинности к рекомбинантному ECD ROR1 человека по результатам SPR, выбирали для дальнейшей биофизической характеристики. Эти домены включают PRO2060, PRO2062, PRO2059 и PRO2066.

[0210] Т.к. ROR1 яванского макака является на 100% идентичным ROR1 человека, не требуется дальнейшей оценки связывания для демонстрации перекрестно-видового связывания этих доменов.

1.7. Биофизическая характеристика scFV-доменов (стабильность при хранении и DSF)

Стабильность при хранении

[0211] Гуманизированные scFv подвергали четырехнедельному исследованию

стабильности, в котором scFv составляли в водном буфере (50 mM NaClP, 150 mM NaCl, pH 6,4) в количестве 10 мг/мл и хранили при температурах 80°C, T_{\text{onset}}) и средней точки разворачивания (T_m). Результаты приведены в таблице 13.

[0212] PRO2059 и PRO2060 (производные клона 55-38-D07) демонстрируют хороший профиль стабильности лишь с минорной потерей мономера при всех тестируемых температурах и общей лучшей термической стабильностью четырех молекул. PRO2062 (производное клона 55-39-G02) уступает PRO2059 и PRO2060 по степени потери мономера при T_m 70,6^{\circ}\text{C}).

[0213] В совокупности, PRO2060 и PRO2062 использовали далее в качестве основных доменов. Эти домены выбирали по сравнению с другими доменами с учетом комбинации фармакодинамических и биофизических характеристик. Обе молекулы связываются с разными эпитопами области 1 ECD ROR1, что делает возможным дополнительное разнообразие кандидатов. Эти основные домены использовали далее для оптимизации посредством белковой инженерии для улучшения баллов оценки Т-клеток и стабильности, как описано в следующем разделе.

1.8. Получение оптимизированных одноцепочечных доменов

[0214] PRO2062 имеет сравнимо высокие, вычисленные *in silico* баллы оценки Т-клеток (1662), что свидетельствует о высокой вероятности стимуляции иммунных ответов при введении людям. Для снижения баллов оценки Т-клеток модифицировали одну из CDR (CDR1H). У кроликов первая половина CDR1H является более консервативной, в то время как вторая половина является более вариабельной. В отличие от всех других распространенных определений CDR (IMGT, Chothia и Honegger), определение CDR по Kabat включает только вариабельную вторую половину CDR1H. Для минимизации риска нарушения связывания встраивали две мутации в консервативную часть CDR1H, т.к. вероятно, что вариабельная часть CDR1H более важна для взаимодействия с антигеном. Анализируя последовательности из того же проекта, можно идентифицировать последовательность CDR1H из другого клона, снижающую баллы оценки Т-клеток и отличающуюся только двумя аминокислотами в консервативной части CDR1H. Кроме того,

эта последовательность CDR1H схожа с вариабельной последовательностью CDR1H PRO2062, что свидетельствует о том, что две мутации (L27I и S28D) в консервативной части CDR1H могут хорошо подойти для структуры белка. Кроме того, мутагенез *in silico* свидетельствует о том, что две мутации не являются дестабилизирующими. В дополнение к снижающим Т-клетки мутациям, пересаживали так называемую внешнюю петлю тяжелой цепи донора, т.к. это важно для правильного позиционирования CDR3H и может служить компенсацией модификаций в CDR1H. В кратком изложении, сегмент (AHo, остатки 82-87) в FW3H заменяли KTST (R82K, D83T, N84S, N87T (S85 и K86 в каркасе делетированы)), AHo89 заменяли с Val на Leu (консенсусная VH3), и AHo90 заменяли с Tug на Asp (донор). Полученные баллы оценки Т-клеток PRO2271 со снижающими баллы оценки Т-клеток мутациями в CDR1H и внешней петлей составляют 1160. Получали один дополнительный вариант (PRO2272, 55-39-G02-sc04), имеющий те же снижающие баллы оценки Т-клеток мутации и внешнюю петлю, что и PRO2271, но с меньшим количеством донорных остатков, чем PRO2271. PRO2292, то есть PRO2062 с дисульфидной связью между AHo 141VL-51VH, имеет относительно высокие баллы оценки Т-клеток (1662).

Таблица 13: Исследование стабильности при хранении в течение 28 дней в количестве 10 мг/мл и при температурах -80°C, 4°C и 40°C и термическая стабильность трансплантатов CDR и полных трансплантатов по результатам DSF.

ID белка	Описание	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Содержание мономера [%]					% потери содержания мономера				DSF	
				d0	d1	d7	d14	d28	d1	d7	d14	d28	T _m [°C]	T _{onset} [°C]
PRO2059	55-38-D07-sc01	-80	9,47	94,3	94,3	94,3	94,3	94,2	0,0	0,0	-0,1	0,0	85,6	69,7
		4		94,3	94,5	94,9	96	94,2	-0,3	-0,6	-1,9	0,1		
		40		94,3	94,5	94,1	93,7	92,9	-0,3	0,2	0,6	1,4		
PRO2060	55-38-D07-sc02	-80	10,2	98,1	98,1	98,2	98,3	98,3	0,0	-0,1	-0,3	-0,2	74,4	58,8
		4		98,1	98,1	98,2	98,2	98,2	0,0	-0,1	-0,2	-0,1		
		40		98,1	97,9	97,5	96,8	95,2	0,2	0,6	1,3	3		
PRO2062	55-39-G02-sc02	-80	9,4	99,3	99,3	99,2	99,3	99,2	0,0	0,1	0	0,1	61,7	56,0
		4		99,3	99,3	99,2	99,2	99,1	0,0	0,1	0,1	0,2		
		40		99,3	94,3	90,5	90,7	90,3	5,0	8,8	8,7	9,1		
PRO2066	55-42-E05-sc02	-80	9,54	96,1	95,8	95,2	95,4	94,8	0,4	1,0	0,8	1,4	70,6	61,0
		4		96,1	94,9	90,6	88,1	85,8	1,3	5,8	8,3	10,8		
		40		96,1	88,4	87,9	87,9	87,4	8,1	8,6	8,6	9,1		

NA: не измерено, ND: неопределимо

[0215] PRO2060 имеет баллы оценки Т-клеток 949, и, таким образом, не требовалась оптимизация баллов оценки Т-клеток. PRO2291, то есть PRO2060 с дисульфидной связью между АНо 141VL-51VH, имеет то же значение баллов оценки Т-клеток 949, что и PRO2060. Оптимизированные варианты обобщены в таблице 14.

Таблица 14: Обзор вариантов PRO2062 и PRO2060

ID PRO	ID домена	Баллы оценки Т-клеток	Мутации и CDR	FW-мутации VL	FW-мутации VH
PRO2062	55-39-G02-sc02	1662	-	см. таблицу выше	см. таблицу выше
PRO2271	55-39-G02-sc03	1160	L27I, S28D	Мутации PRO2062	Мутации PRO2062+R82K, D83T, N84S, N87T, Y90D (S85 и K86 в каркасе делетированы); V89L (обратно в консенсусную VH3)
PRO2292	55-39-G02-sc05	1662	-	Мутации PRO2062+T141C	Мутации PRO2062+G51C
PRO2060	55-38-D07-sc02	949	-	см. таблицу выше	см. таблицу выше
PRO2291	55-38-D07-sc06	949	-	Мутации PRO2060+T141C	Мутации PRO2060+G51C

1.9. Характеризация оптимизированных одноцепочечных доменов

Связывание клеток оптимизированными scFv с ROR1-экспрессирующими клетками MDA-MB-231 по результатам проточной цитометрии

[0216] Связывание на плазматической мембране оптимизированных scFv с экспрессирующими ROR1 человека клетками MDA-MB-231 посредством проточной цитометрии анализировали, как описано выше. В кратком изложении, подготавливали 5-кратные серийные разведения оптимизированных scFv клона против ROR1 55-39-G02 (PRO2271, PRO2292) и клона 55-38-D07 (PRO2291), а также референсного Fab-фрагмента PRO2213, начиная с концентрации 40 нМ, а затем добавляли на планшеты с клетками. После инкубации при 4°C в течение 1 ч. планшеты промывали и инкубировали со специфическими детекторными антителами. Интенсивность флуоресценции по каналу APC регистрировали для каждого образца с использованием проточного цитометра NovoCyte

2060 и вычисляли геометрическое среднее интенсивности флуоресценции MFI.

[0217] Кажущуюся аффинность связывания оптимизированных scFv PRO2271, PRO2291 и PRO2292 к ROR1 человека на плазматической мембране оценивали в экспериментах по проточной цитометрии. Вычисленные значения EC_{50} , относительной EC_{50} , а также относительного максимального связывания, полученные в этих экспериментах, приведены в таблице 15. Как показано на фигуре 2, все scFv демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231, в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7. PRO2271, вариант PRO2062 с оптимизацией баллов оценки T-клеток и пересадкой внешней петли, демонстрировал в приблизительно два раза меньшую кажущуюся аффинность связывания по сравнению с исходным scFv PRO2062. PRO2291 и PRO2292, являющиеся вариантами PRO2060 и PRO2062, включающими VL-VH-междоменную дисульфидную связь для стабилизации, демонстрировали кажущиеся аффинности связывания, сравнимые с кажущимися аффинностями связывания родительских scFv PRO2060 и PRO2062.

Таблица 15: Кажущаяся аффинность связывания оптимизированных scFv против ROR1 PRO2271, PRO2291 и PRO2292 к человека ROR1, экспрессирующимся на клетках MDA-MB-231, по результатам проточной цитометрии. PRO2213 использовали в качестве референсного антитела против ROR1.

ID белка	Описание	EC_{50} [нМ]	Отн. EC_{50} (EC_{50} , PRO2213/ EC_{50} , scFv)	Отн. максимальное связывание ($MFI_{scFv}/MFI_{PRO2213}$)
PRO2271	55-39-G02-sc03	0,63	1,34	0,87
PRO2291	55-38-D07-sc06	2,74	0,27	1,18
PRO2292	55-39-G02-sc05	0,27	2,61	1,18

Аффинность связывания по результатам SPR

[0218] Кинетика связывания (включая аффинность) оптимизированного scFv PRO2071, PRO2291 и PRO2292 с рекомбинантным белком ROR1 человека (Fc-метка, Ascо Biosystems) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva), как описано в разделе 1.6.

[0219] Аффинность к ROR1 человека определяли вместе с неоптимизированными версиями для сравнения. результаты анализа SPR обобщены в таблице 16.

Таблица 16: Обобщение измерений аффинности к hROR1 для оптимизированного scFv по сравнению с неоптимизированными (в том же эксперименте).

# белка	описание белка	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	Уровень
---------	----------------	--------------	-------------	-----------	---------

					связывания, нормализованный по теоретическому $R_{max}(\%)$
PRO227 1	55-39-G02-sc03	1,59E+06	5,78E-04	3,64E-10	52,7
PRO229 1	55-38-D07-sc06	2,69E+05	3,02E-04	1,12E-09	26,9
PRO229 2	55-39-G02-sc05	6,80E+06	6,16E-04	9,06E-11	49,6
PRO206 0	55-38-D07-sc02	3,35E+05	9,56E-05	2,85E-10	17,3
PRO206 2	55-39-G02-sc02	5,29E+06	4,90E-04	9,26E-11	57,8

1.10. Биофизическая характеристика scFV-доменов (стабильность при хранении и DSF)

[0220] Оптимизированные варианты гуманизованных scFv подвергали четырехнедельному исследованию стабильности, в котором scFv составляли в водном буфере (50 mM NaClP, 150 mM NaCl, pH 6,4) в количестве 10 мг/мл и хранили при температурах < -80°C, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 17 приведено содержание мономера в % и % потери мономера относительно d0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования. Т.к. не наблюдали значимых изменений для любых из образцов относительно d0, данные не приведены. Термическую стабильность анализировали посредством nDSF (NanoTemper) определяя точку начала разворачивания (T_{onset}) и среднюю точку разворачивания (T_m). результаты приведены в таблице 17.

[0221] Оптимизированное производное клона 55-39-G02 (PRO2271) демонстрирует схожую стабильность с PRO2062. Производные клона 55-38-D07 и 55-39-G02 с дисульфидной связью VL-VH (PRO2291 и PRO2292) демонстрируют улучшенную стабильность по сравнению с соответствующими конструкциями без дисульфидной связи (PRO2060 и PRO2062), и их можно рассматривать в качестве в целом наиболее стабильных scFV-доменов.

Пример 2: Получение и тестирование молекул против CD3:

[0222] Идентификацию, выбор и гуманизацию IgG кролика против CD3 клона 28-21-D09, а также получение и характеристику соответствующего гуманизованного scFv против CD3 28-21-D09-sc04 (PRO726) осуществляли, как описано в патентной заявке № WO

2018/224441, включенной, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки. Характеризация scFv против CD3 PRO726 в кратком изложении приведена далее.

2.1. Характеризация scFv против CD3 28-21-D09-sc04 (PRO726)

Аффинность связывания и перекрестно-видовая реактивность (FS)

[0223] Кинетику связывания (включая аффинность) выбранного связывающего домена 28-21-D09-sc04 (PRO726) с рекомбинантным белком внеклеточного домена CD3 эpsilon человека (hCD3ε; His-метка, SinoBiological) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Рекомбинантные молекулы hCD3ε ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и серию титров PRO726 инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0) и инъецировали новую концентрацию PRO726.

Таблица 17: Исследование стабильности при хранении в течение 28 дней в количестве 10 мг/мл и при температурах -80°C, 4°C и 40°C и термическая стабильность оптимизированных scFV-доменов по результатам DSF.

ID PRO	Описание	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Содержание мономера [%]					% потери содержания мономера				DSF	
				d0	d1	d7	d14	d28	d1	d7	d14	d28	T _m [°C]	T _{onset} [°C]
PRO22 71	55-39-G02-sc03	-80	10,0	99,5	99,5	99,6	99,5	99,3	0,1	0,0	0,0	0,3	ND	ND
		4		99,5	99,5	99,3	99,2	99,0	0,0	0,2	0,3	0,6		
		40		99,5	90,5	90,6	90,5	90,7	9,1	9,0	9,1	8,9		
PRO22 91	55-38-D07-sc06	-80	9,3	99,6	NA	NA	NA	99,6	NA	NA	NA	0,0	72,0	57,7
		4		99,6	99,6	NA	99,6	99,6	0,0	NA	0,0	0,0		
		40		99,6	99,6	NA	NA	98,5	0,0	NA	NA	1,1		
PRO22 92	55-39-G02-sc05	-80	9,5	96,6	NA	NA	NA	96,6	NA	NA	NA	0,0	ND	59,7
		4		96,6	96,5	96,6	96,7	96,6	0,1	-0,1	-0,1	0,0		
		40		96,6	96,6	96,5	96,5	96,3	0,0	0,1	0,1	0,3		

NA: не измерено, ND: неопределимо

Таблица 18: Обобщение измерений аффинности к hCD3ε и cCD3ε для выбранного scFv PRO726 (домен 28-21D09-sc04).

ID белка	Лиганд	k _{a1} (1/Мс)	k _{d1} (1/с)	K _{D1} (М)	k _{a2} (1/Мс)	k _{d2} (1/с)	K _{D2} (М)	K _D (М)
PRO726	hCD3ε	6,5E+05	5,5E-03	8,3E-09	1,4E-03	2,4E-03	1,8E+00	5,3E-09
PRO726	cCD3ε	8,2E+05	6,2E-03	7,5E-09	1,5E-03	2,6E-03	1,8E+00	4,8E-09

[0224] Кинетику связывания с hCD3ε измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с восьмью концентрациями аналита в диапазоне от 0,7 до 90 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Bioconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_{d1}) и ассоциации (k_{a1}), константы второй реакции (k_{a2} и k_{d2}) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием двухуровневой модели связывания и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе относительного χ^2 . Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0225] Кинетику связывания с рекомбинантным CD3ε яванского макака (сCD3ε; His-метка; SinoBiological) измеряли, как указано выше для hCD3ε, за исключением того, что использовали сCD3ε вместо hCD3ε. Результаты обобщены в таблице 18.

Биофизическая характеристика

[0226] Гуманизированный CD3-связывающий домен подвергали четырехнедельному исследованию стабильности, в котором scFv составляли в водном буфере (50 mM NaClP, 150 mM NaCl, pH 6,4) в количестве 10 мг/мл и хранили при температурах < -80°C, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 19 приведено содержание мономера в % и % потери мономера относительно d0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования. Не наблюдали значимой потери содержания белка для любых из образцов относительно d0, данные не приведены.

[0227] Данные термического разворачивания, полученные из измерений дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), приведены в таблице 19. Полученную среднюю точку термического разворачивания (T_m) и температуру начала перехода (T_{onset}) для разворачивания определяли посредством аппроксимации данных по уравнению Больцмана.

Таблица 19: Четырехнедельное исследование стабильности домена 28-21-D09-sc04.

ID белка	Описание	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	[% содержания мономера]					% потери мономера				T_m [°C]
				d0	d1	d7	d14	d28	d1	d7	d14	d28	
PRO726	28-21-	-80,0	10,0	93,9	93,1	93,3	NA	93,1	0,8	0,7	N A	0,9	68,1

	D09-	4,0		93,9	88,0	86,8	85,8	86,0	6,3	7,6	8,7	8,4	
	sc04	40,0		93,9	86,4	87,1	86,7	85,8	8,1	7,3	7,7	8,7	

NA: не измерено

Пример 3: Получение и тестирование молекул против hSA:

[0228] Идентификацию, выбор, гуманизацию, а также получение и характеристику гуманизованного связывающего домена против hSA 19-01-H04-sc03 (PRO0325) и 23-13-A01-sc03 (PRO0459) осуществляли, как описано в патентной заявке № EP 19 206 959.9, включенной, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки. Идентификацию, выбор, гуманизацию, а также получение и характеристику гуманизованного связывающего домена против hSA 19-04-A10-sc02 (PRO2155) осуществляли аналогично описанному в патентной заявке № EP 19 206 959.9. Характеризация scFv против CD3 PRO2155 в кратком изложении описана ниже.

3.1. Характеризация scFv против hSA 19-04-A10-sc02 (PRO2155)

Аффинность связывания и перекрестно-видовая реактивность

[0229] Кинетика связывания (включая аффинность) выбранного домена 19-04-A10-sc02 с сывороточным альбумином человека (hSA, Sigma-Aldrich A3782) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva) при pH 7,4 и pH 5,5. Молекулы hSA ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5, Biacore, Cytiva) и серию титров каждой молекулы scFv инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0) и инъецировали новую концентрацию молекулы scFv. Кинетику связывания с hSA измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с одиннадцатью концентрациями от 0,044 до 45 нМ (1:2), разведенными в соответствующем подвижном буфере (PBS с 0,05% Tween-20 или PBS с 0,05% Tween-20, pH 5,5). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущаяся равновесная константа диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 . Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0230] Кинетику связывания выбранного scFv также определяли для сывороточного альбумина яванского макака (cSA, Molecular Innovations CYSA) и сывороточного альбумина мыши (mSA, Sigma-Aldrich A3559), как описано выше, с тем отличием, что использовали cSA или mSA вместо hSA. Кинетика связывания с hSA, mSA и cSA при pH 5,5 и pH 7,4 обобщена в таблице 20.

Таблица 20: обобщение измерения аффинности к hSA, cSA и mSA для молекулы, связывающей сывороточный альбумин, scFv PRO2155 (домен 19-04-A10-sc02).

#ID белка	Описание белка	Тестовый pH	Антиген	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH5,5	CSA	9,1E+05	2,1E-03	2,3E-09
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH5,5	HSA	9,0E+05	3,0E-03	3,3E-09
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH5,5	MSA	7,8E+04	2,0E-04	2,5E-09*
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH7,4	CSA	5,8E+05	9,1E-04	1,6E-09
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH7,4	HSA	5,5E+05	1,2E-03	2,2E-09
PRO2155	19-04-A10-sc02	pH7,4	MSA	3,2E+04	2,9E-04	9,0E-09*

* двухфазное связывание корректировали с помощью совокупной коррекции при аппроксимации 1:1, что приводило к более низкому максимальному ответу

Биофизическая характеристика

[0231] HSA-домены 19-04-A10-sc02 (PRO2155) и 19-04-A10-sc06 (домен sc02 с дисульфидной связью VL-VH, VL-T141C/VH-G51C, нумерация АНо; PRO2317) подвергали четырехнедельному исследованию стабильности, в котором scFv составляли в водном буфере (50 мМ NaClP, 150 мМ NaCl, pH 6,4) в количестве 10 мг/мл и хранили при температурах $<-80^{\circ}\text{C}$, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Фракции мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 21 обобщены содержание мономера в % и % потери мономера относительно d0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования. Т.к. не наблюдали значимой потери содержания белка для любых из образцов относительно d0, данные не приведены. Термическую стабильность анализировали посредством nDSF (NanoTemper), определяя точку начала разворачивания (T_{onset}) и среднюю точку разворачивания (T_m). Результаты DSF приведены в таблице 21.

Таблица 21: Четырехнедельное исследование стабильности доменов 19-04-A10-sc02 и 19-04-A10-sc06 против hSA.

ID белка	Описание	Температура [°C]	Концентрация	Содержание мономера [%]					% потери мономера				T_m [°C]
				d0	d1	d7	d14	d28	d1	d7	d14	d28	
											4		

			я [мг/ мл]										
PRO2 155	19- 04- A1	-80	10,4	99,4	NA	NA	NA	99,5	NA	N	N	-0,1	75,3
	0- sc0	4,0		99,4	99,4	NA	NA	99,1	0,1	N	N	0,3	
	2	40,0		99,4	98,6	NA	NA	89,1	-0,8	N	N	10,4	
											A	A	
PRO2 317	19- 04- A1 0- sc0 6	40,0	10,5	99,2	98,8	98,7	98,6	98,4	0,4	0,6	0,7	0,9	78,4

NA: не измерено

Пример 4: Получение и продуцирование мультиспецифических антител scMATCH3 против ROR1×CD3×hSA

[0232] HSA-, CD3- и ROR1-связывающие домены комбинировали в триспецифическом формате scMATCH3. Формат scMATCH3 состоит исключительно из переменных доменов, соединенных GS-линкерами разной длины, как показано на фигуре 3. В этом формате отдельные переменные домены находятся на единой пептидной цепи (sc), собираясь в полностью функциональные триспецифические молекулы. Аналогично scFV-доменам, можно встраивать дисульфидные связи VL/VH для стабилизации отдельных доменов. Молекулы scMATCH3 можно экспрессировать рекомбинантно в клетках млекопитающих и для их очистки можно использовать общепринятую стадию аффинной хроматографии.

[0233] Экспрессию конструкций scMATCH3 млекопитающих осуществляли в клетках CHO-S с использованием набора для транзиторной трансфекции CHOgro (Mirus). Культуры собирали после 5-7 дней (когда жизнеспособность клеток достигала <70%) экспрессии при 37°C посредством центрифугирования с последующей фильтрацией. Белки очищали из осветленных супернатантов культур посредством аффинной хроматографии с протеином L с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ сахарозы при pH 6,5. Содержание мономера во фракциях SEC оценивали посредством анализа SE-ВЭЖХ и объединяли фракции с содержанием мономера >95%. Для контроля качества произведенного материала использовали стандартные аналитические способы, такие как SE-ВЭЖХ, UV₂₈₀ и электрофорез в ПААГ с SDS. Молекулярная композиция домена и описание производства молекул scMATCH3

приведены в таблице 22.

[0234] Молекулы scMATCH3 PRO2667 и RPO2668, содержащие модифицированные или улучшенные ROR1-, CD3- и hSA-связывающие домены, продуцировали в масштабе 1 л в Evitria AG (Schlieren, Switzerland) с использованием их собственной экспрессионной системы млекопитающих. Белки очищали из осветленных супернатантов культур посредством аффинной хроматографии с протеином L (CaptoL, Cytiva) с последующей SEC в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 300 mM сахарозой при pH 6,5. Содержание мономера во фракциях SEC оценивали посредством анализа SE-ВЭЖХ и объединяли фракции с содержанием мономера >95%. Для контроля качества произведенного материала использовали стандартные аналитические способы, такие как SE-ВЭЖХ, UV₂₈₀ и электрофорез в ПААГ с SDS. Описание производства этих молекул scMATCH3 приведено в таблице 23. Термическую стабильность молекул оценивали посредством nDSF с использованием устройства Prometheus NT.48 (NanoTemper).

Таблица 22: Архитектура молекул ScMATCH3, конечный титр и чистота мономера по результатам SE-ВЭЖХ.

ID PRO	Формат	Домен 1, положение scDb-o (hSA)	Домен 2, положение scDb-i (CD3)	Домен 3, положение scFv (ROR1)	Конечный титр [мг/л культуры]	Содержание мономера [%]
PRO2507	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc02	1,9	99,2
PRO2508	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc06	2,3	99,1
PRO2509	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc02	2,2	98,7
PRO2510	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc05	2,7	99,0
PRO2557	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc06	2,0	98,4

Таблица 23: Производство молекул scMATCH3 PRO2667 и RPO2668

ID белка	Формат	Титр захвата [мг/л]	Титр [мг/л]	Чистота по результатам SE-ВЭЖХ мономера [%]	nDSF T _{M1} [°C]	nDSF T _{M2} [°C]
PRO2667	scMATCH3	66,3	25,7	98,7	62,5	71,2

PRO2668	scMATC H3	47,1	23,9	99,7	64,6	74,0
---------	--------------	------	------	------	------	------

Пример 5: Фармакодинамическая характеристика молекул scMATCH3

5.1. Аффинность связывания по результатам SPR

[0235] Кинетика связывания для девяти мультиспецифических молекул scMATCH3 с тремя мишенями, ROR1 человека (hROR1), CD3ε человека (hCD3ε) и hSA, тестировали посредством SPR.

Аффинность связывания с hROR1 по результатам SPR

[0236] Кинетику связывания (включая аффинность) девяти молекул scMATCH3 с рекомбинантным белком ROR1 человека (Fc-метка, Acro Biosystems) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva), как описано в разделе 1.6. Рекомбинантные молекулы ROR1 человека ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и серию титров каждой молекулы MATCH3 инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0, и 3 М MgCl₂) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATCH3. Кинетику связывания с ROR1 человека измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с девятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,088 до 45 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Bioconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 и U-критерия, являющихся показателями качества аппроксимации кривых. Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0237] Кинетику связывания с hROR1 определяли для девяти scMATCH3 с аффинностями в диапазоне от 1,6 нМ до 0,12 нМ (таблица 24). Аффинности к hROR1 для всех тестируемых молекул scMATCH3 были схожи с таковыми для соответствующего родительского scFv.

Таблица 24: Обобщение измерений аффинности к hROR1 для молекул scMATCH3.

ID белка	Описание белка	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
PRO2287	19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv	1,3E+06	4,0E-04	3,2E-10
PRO2507	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc02-scFv	8,2E+04	<1,00E-05	1,2E-10

PRO2508	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc06-scFv	7,6E+04	< 1,00E-05	1,3E-10
PRO2509	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02-scFv	1,3E+06	4,7E-04	3,6E-10
PRO2510	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc05-scFv	1,3E+06	6,0E-04	4,6E-10
PRO2286	23-13-A01-sc02 diS scDb-o/28-21-D09- sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02-scFv	1,4E+06	4,5E-04	3,3E-10
PRO2557	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc06-scFv	4,2E+05	6,7E-04	1,6E-09
PRO2667	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21- D09-sc04(RTQ)scDb-i/55-38-D07- sc02(RTQ)-scFv	9,5E+04	9,2E-05	9,7E-10
PRO2668	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21- D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-39-G02- sc05(RTQ)-scFv	2,0E+06 ± 7,6E+04	5,6E-04± 6,7E-05	2,8E-10± 2,2E-11

Аффинность связывания с hCD3ε по результатам SPR

[0238] Кинетику связывания (включая аффинность) девяти выбранных молекул scMATCH3 с рекомбинантным белком внеклеточного домена CD3 ε человека (hCD3ε; His-метка, SinoBiological) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Рекомбинантные молекулы hCD3ε ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и серию титров каждой молекулы MATCH3 инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0, и 3 М MgCl₂) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATCH3. Кинетику связывания с hCD3ε измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с девятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,088 до 45 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Biosconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_{d1}) и ассоциации (k_{a1}), константы второй реакции (k_{a2} и k_{d2}) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием двухуровневой модели связывания и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 . Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0239] Кинетику связывания с hCD3ε определяли для 9 МАТЧЗ с аффинностями в диапазоне от 9,4 нМ до 1,5 нМ (таблица 25). Аффинности к hCD3ε всех тестируемых молекул МАТЧЗ являлись схожими с таковыми у родительского scFv 28-21-D09-sc04.

Таблица 25: Обобщение измерения аффинности к hCD3ε для выбранных молекул МАТЧЗ.

#ID белка	Описание белка	k_{a1} (1/Мс)	k_{d1} (1/с)	k_{a2} (1/с)	k_{d2} (1/с)	K_D (М)
PRO228 7	19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv	8,7E+05	3,4E-03	1,7E-03	2,0E-03	2,1E-09
PRO250 7	19-04-A10-sc06 scDb-o/28- 21-D09-sc04 scDb-i/55-38- D07-sc02 scFv	3,4E+05	6,0E-03	6,9E-03	7,8E-03	9,4E-09
PRO250 8	19-04-A10-sc06 scDb-o/28- 21-D09-sc04 scDb-i/55-38- D07-sc06 scFv	3,8E+05	6,2E-03	6,8E-03	7,4E-03	8,5E-09
PRO250 9	19-04-A10-sc06 scDb-o/28- 21-D09-sc04 scDb-i/55-39- G02-sc02 scFv	1,0E+06	3,4E-03	9,6E-04	1,6E-03	2,1E-09
PRO251 0	19-04-A10-sc06 scDb-o/28- 21-D09-sc04 scDb-i/55-39- G02-sc05 scFv	1,0E+06	3,6E-03	1,3E-03	2,0E-03	2,1E-09
PRO228 6	23-13-A01-sc02 diS scDb- o/28-21-D09-sc04 scDb- i/55-39-G02-sc02 scFv	1,1E+06	2,7E-03	6,9E-04	1,1E-03	1,5E-09
PRO255 7	19-04-A10-sc06 scDb-o/28- 21-D09-sc04 scDb-i/55-39- G02-sc06 scFv	4,3E+05	3,1E-03	4,2E-04	1,4E-03	5,5E-09
PRO266 7	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-38-D07- sc02(RTQ)-scFv	5,4E+05	4,1E-03	4,5E-03	6,1E-03	4,4E-09
PRO266 8	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04	2,5E+06 ±	4,7E- 03±	4,9E- 03±	2,3E- 03±	1,8E- 09±

(RTQ) scDb-i/55-39-G02- sc05(RTQ)-scFv	1,4E+06	8,5E-04	1,6E-03	7,2E-04	9,2E-10
---	---------	---------	---------	---------	---------

Аффинность связывания с hSA по результатам SPR

[0240] Кинетику связывания (включая аффинность) семи выбранных молекул scMATCH3 с сывороточным альбумином человека (hSA, Sigma-Aldrich) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Молекулы hSA ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и инъецировали серию титров каждой молекулы MATCH3 в качестве аналита (эксперимент ND032-0033). После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATCH3. Кинетику связывания с hSA измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с десятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,352 до 180 нМ, разведенными 1:2 в соответствующем подвижном буфере (PBS, 0,05% Tween-20, pH 5,5). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 и U-критерия, являющихся показателями качества аппроксимации кривой. Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0241] Кинетику связывания с hSA определяли для семи молекул MATCH3 (таблица 26). Аффинность hSA при pH 5,5 для всех тестируемых молекул MATCH3 считают достаточной для увеличения системного времени полужизни молекул MATCH3.

Таблица 26: Обобщение измерения аффинности to hSA for selected MATCH3 молекулы.

#ID белка	Описание белка	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
PRO2287	19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv	1,7E+06	3,0E-04	1,7E-10
PRO2507	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc02 scFv	4,0E+05	1,7E-03	4,3E-09
PRO2508	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc06 scFv	4,2E+05	1,8E-03	4,3E-09
PRO2509	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv	9,4E+05	2,0E-03	2,1E-09
PRO2510	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc05 scFv	1,0E+06	2,1E-03	2,0E-09

PRO2286	23-13-A01-sc02 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv	1,1E+06	6,7E-05	6,2E-11
PRO2557	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc06 scFv	4,5E+05	2,0E-03	4,4E-09
PRO2558	19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/56-22-A05-sc02 scFv	4,6E+05	2,0E-03	4,4E-09
PRO2667	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-38-D07-sc02(RTQ)-scFv	3,8E+05	1,2E-03	3,2E-09
PRO2668	19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-39-G02-sc05(RTQ)-scFv	1,1E+06± 3,9E+05	1,5E-03± 2,0E-04	1,4E-09± 3,6E-10

5.2. Связывание клеток молекулами scMATCH3 с ROR1 человека по результатам проточной цитометрии

[0242] Связывание клеток молекулами против ROR1 scMATCH3 с ROR1-экспрессирующими клетками MDA-MB-231 анализировали посредством проточной цитометрии, как описано в разделе 1.6. В кратком изложении, подготавливали 5-кратные серийные разведения молекул scMATCH3, начиная с 40 нМ (PRO2286, PRO2287) или 120 нМ (PRO2507, PRO2508, PRO2509, PRO2510, PRO2557), а также референсного Fab-фрагмента PRO2213, начиная с концентрации 40 нМ или 120 нМ, а затем добавляли на планшеты с клетками. После инкубации при 4°C в течение 1 ч. в присутствии 1 мг/мл сывороточного альбумина человека (hSA), планшеты промывали и инкубировали со специфическими детекторными антителами. Интенсивность флуоресценции по каналу APC регистрировали для каждого образца с использованием проточного цитометра NovoCyte 2060 и вычисляли геометрическое среднее интенсивности флуоресценции MFI.

[0243] Связывание молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 с ROR1 человека на плазматической мембране оценивали посредством проточной цитометрии. Вычисленные значения EC_{50} , относительной EC_{50} , а также относительного максимального связывания, полученные в этих экспериментах, приведены в таблице 27. Как показано на фигуре 4, молекулы scMATCH3 PRO2286 и PRO2287, обе из которых несут один и тот же ROR1-BD 55-39-G02-sc02, но разные hSA-BD, демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231, в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7. По сравнению со значениями относительной EC_{50} родительского scFv PRO2062 (домен против ROR1 55-39-G02-sc02), обе молекулы scMATCH3 демонстрировали в приблизительно пять раз более низкую EC_{50} связывания (относительная EC_{50} PRO2286=0,63, относительная EC_{50} PRO2287=0,47; средняя относительная EC_{50} PRO2062=2,77). Предполагают, что эта сниженная EC_{50} связывания

молекул scMATCH3 является результатом стерического затруднения, вызванного hSA, связанным с молекулами scMATCH3. В соответствии с этим, другие молекулы scMATCH3, несущие домен против ROR1 55-39-G02-sc02 (PRO2509), или их оптимизированные варианты (PRO2510: 55-39-G02-sc05, PRO2557: 55-39-G02-sc06) демонстрировали EC_{50} связывания, сниженную в 5-10 раз по сравнению с соответствующим scFv. В деталях, значения относительной EC_{50} PRO2509, PRO2510 и PRO2557 составляли 0,53 (2,77 для соответствующего scFv, PRO2062), 0,3 (2,61 для PRO2292) и 0,21, соответственно.

[0244] Оптимизированный вариант PRO2510, PRO2668, измеряли посредством проточной цитометрии с использованием тех же экспериментальных условий. В этом эксперименте PRO2668 демонстрировал связывание с клетками MDA-MB-231, сравнимое с PRO2510, на что указывает схожая активность связывания, а также значение относительного максимального связывания. Кривые доза-ответ этих молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 можно найти на фигуре 4 и фигуре 5. Что касается молекул scMATCH3, сконструированных с использованием домена против ROR1 55-38-D07-sc02 (PRO2507) и 55-38-D07-sc06 (PRO2508), их EC_{50} связывания также оказалась сниженной по сравнению с соответствующим scFv. В деталях, значения относительной EC_{50} PRO2507 и PRO2508 составляли 0,03 (0,33 для соответствующего scFv, PRO2060) и 0,04 (0,27 для PRO2291), соответственно. Кривые концентрация-ответ этих молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 можно найти на фигуре 5.

[0245] В совокупности, все молекулы scMATCH3 демонстрировали специфическое связывание с экспрессирующими ROR1 человека клетками, и наблюдали более высокую EC_{50} связывания в случае молекул, несущих клон против ROR1 55-39-G02 по сравнению с серией молекул, сконструированных с использованием клона против ROR1 55-38-D07. Вероятно, по причине стерического затруднения, вызванного hSA, связанным с молекулами scMATCH3, наблюдали в 5-10 раз более низкое связывание в случае молекул scMATCH3 по сравнению с соответствующим scFv. Результаты для данных о связывании клеток приведены в таблице 27. Показаны вычисленные значения EC_{50} , относительной EC_{50} , а также относительного максимального связывания. Fab-фрагмент PRO2213 использовали в качестве референсного антитела против ROR1.

Таблица 27: Связывание молекул scMATCH3 против ROR1×hSA×CD3 PRO2286, PRO2287, PRO2507, PRO2508, PRO2509, PRO2510, PRO2557 и PRO2668 с ROR1 человека, экспрессирующимся на клетках MDA-MB-231, по результатам проточной цитометрии.

ID белка	Формат	Домен 1, положение scDb-o (hSA)	Домен 2, положение scDb-i (CD3)	Домен 3, положение scFv (ROR1)	EC₅₀ [нМ]	Отн. EC₅₀ (EC₅₀, PRO2213/E C₅₀, scMATCH3)	Отн. максимальное связывание (MFI_{scMATCH3}/MFI_{PRO2213})
PRO2286	scMATCH3	23-13-A01-sc02 diS	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc02	1,33	0,63	1,87
PRO2287	scMATCH3	19-01-H04-sc02 diS	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc02	1,83	0,46	1,98
PRO2507	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc02	26,86	0,03	2,88
PRO2508	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc06	18,74	0,04	3,00
PRO2509	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc02	1,12	0,53	2,57
PRO2510	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc05	1,36	0,30	2,61
PRO2557	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc06	3,27	0,21	2,43
PRO2668	scMATCH3	19-04-A10-sc06	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc05	0,74	0,52	2,89

Пример 6: Оценка активности: Цитотоксичность в отношении клеток-мишеней и активация Т-клеток, опосредованная молекулами scMATH3

[0246] Для понимания способности этих молекул scMATH3 способствовать уничтожению опухолевых клеток и активации CD8 Т-клеток, авторы настоящего изобретения проводили серию анализов цитотоксичности для сравнения активностей и профилей активации Т-клеток между основными кандидатами.

[0247] Во-первых, тестировали уровни экспрессии ROR1 на нескольких линиях клеток вместе с количественным анализом относительных уровней рецептора на поверхности (фигура 6). Клетки инкубировали последовательно с Zombie NIR live/dead APC-Cy7 (Biolegend, 1:500) при 4°C в течение 20 минут с последующей стадией промывки, а затем с PE-конъюгированным антителом против ROR1 (Biolegend, 1:25) при 4°C в течение 20 минут с последующей промывкой и подсчетом с помощью проточного цитометра Novocyte (ACEA). На фигуре 6А показана поверхностная экспрессия ROR1 на клетках MDA-MB-231 и MCF7. Уровни рецептора количественно анализировали с использованием набора Quantum Simply Cellular anti-mouse IgG kit (Bangs Laboratories) по рекомендациям производителя. Бусы и клетки анализировали с помощью проточного цитометра Attune NxT (ThermoFisher) и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo (BD). Относительные поверхностные уровни ROR1 были выше на клетках MDA-MB-231 по сравнению с клетками MCF7. Поверхностные уровни ROR1 на клетках MCF7 считали очень низкими, сравнимыми со здоровой тканью взрослых людей. Таким образом, клетки MCF7 использовали в качестве отрицательного контроля (фигура 6В).

[0248] Эти анализы осуществляли с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных из лейкоцитарных пленок с помощью пробирок SepMate с Lymphoprep (StemCell Technologies) для создания градиента плотности, по рекомендациям производителя.

[0249] Выделенные PBMC сокультивировали в течение 40 часов с интересующими ROR1-положительными и -отрицательными опухолевыми клетками при соотношении эффектор:мишень 10:1. После сокультивирования 100 мкл супернатанта аспирировали для тестирования на высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из умирающих клеток с использованием набора для определения цитотоксичности от Roche. Оставшийся супернатант замораживали при -80°C для последующего мультиплексного анализа цитокинов. Клетки метили следующими реагентами или антителами (все от Biolegend) для анализа активации специфических Т-клеток посредством проточной цитометрии: фиксируемый краситель Live/Dead Aqua, APC-Cy7-конъюгированное антитело против CD4 человека (клон ОКТ4), PE-Cy7-конъюгированное антитело против CD11c человека (клон Bu15), PerCP-Cy5.5-конъюгированное антитело против CD8 человека (клон SK1) и PE-конъюгированное антитело против CD69 человека (клон FN50). Клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра (Attune, ThermoFisher Scientific) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD) на положительную регуляцию CD69 как показатель активации CD4 и CD8 Т-клеток.

[0250] Все тестируемые молекулы scMATCH3 приводили к специфическому уничтожению ROR1-положительных клеток, таких как MDA-MB-231, и наблюдали активность от минимальной до отсутствующей в отношении ROR1-отрицательной линии клеток MCF7 (фигура 7A). Полученные из PRO2060 молекулы scMATCH3 PRO2507 и PRO2508 демонстрировали немного более низкие активности по сравнению с полученными из PRO2062 молекулами PRO2509 и PRO2510, что соответствовало более высокой наблюдаемой аффинности PRO2062. Активацию CD8 и CD4 Т-клеток тщательно отслеживали с использованием данных о цитотоксичности (фигура 7B и 7C).

[0251] Молекула scMATCH3 PRO2557, домен которой получали из PRO2062 и оптимизировали по баллам оценки Т-клеток для снижения иммуногенности, также опосредовала специфическое уничтожение ROR1-положительных клеток (фигура 8A). Так же, как и в случае других молекул scMATCH3, активация CD8 и CD4 Т-клеток коррелировала с наблюдаемой цитотоксичностью (фигура 8B и фигура 8C, соответственно). В таблице 28 приведены средние значения EC_{50} , полученные для специфического уничтожения клеток MDA-MB-231 в случае молекул scMATCH3 в разных экспериментах.

Таблица 28: Обобщение ключевых данных о цитотоксичности из исследований scMATCH3, проведенных с использованием РВМС

ID PRO	Формат	Домен ROR1	№ эксперимента (n)	EC_{50} (нМ) цитотоксичности (MDA-MB-231)
PRO2507	scMATCH3	PRO2060	4	1,0
PRO2508	scMATCH3	PRO2060+diS	2	1,7
PRO2509	scMATCH3	PRO2062	4	0,31
PRO2510	scMATCH3	PRO2062+diS	4	0,43
PRO2557	scMATCH3	PRO2271 (PRO2062 с модификацией по баллам оценки Т-клеток)	2	3,1

Пример 7: Биофизическая характеристика молекул scMATCH3

[0252] Молекулы scMATCH3 подвергали четырехнедельному исследованию стабильности, в котором молекулы составляли в водном буфере (50 mM NaClP, 300 mM сахарозы, pH 6,5) в количестве 1 мг/мл и хранили при $< -80^{\circ}C$, $4^{\circ}C$ и $40^{\circ}C$ в течение четырех недель. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством

интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 29 приведено содержание мономера в % и % потери мономера относительно d0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования, и они приведены в таблице 30. Термическую стабильность анализировали посредством nDSF (NanoTemper), определяя точку начала разворачивания (T_{onset}) и среднюю точку разворачивания (T_m). Результаты Nano DSF по средней точке разворачивания (T_m) приведены в последних столбцах таблицы 29.

Таблица 29: Оценка стабильности scMATCH3 в концентрации 1 мг/мл, изменение содержания мономера с течением времени.

ID белка	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Содержание мономера [%]				% потери содержания мономера			T_m [°C]
			d0	d7	d14	d28	d7	d14	d28	
PRO250 7	-80	1,05	98,5	NA	NA	98,8*	NA	NA	-0,4*	63,7
	4,0		98,5	98,6	98,8	98,8	-0,1	-0,4	-0,4	
	40,0		98,5	98,0	97,7	96	0,5	0,8	2,5	
PRO250 8	-80	1,02	98,4	NA	NA	98,8*	NA	NA	-0,4*	65,1
	4,0		98,4	98,6	98,7	98,7	-0,2	-0,3	-0,3	
	40,0		98,4	98,0	97,7	96,2	0,5	0,7	2,3	
PRO250 9	-80	1,03	98,4	NA	NA	98,7*	NA	NA	-0,3*	61,4
	4,0		98,4	98,5	98,7	98,5	0,0	-0,3	-0,1	
	40,0		98,4	97,5	97,2	95,1	0,9	1,2	3,4	
PRO251 0	-80	1,04	98,2	NA	NA	98,5*	NA	NA	-0,3*	63,8
	4,0		98,2	98,4	98,6	98,5	-0,2	-0,4	-0,2	
	40,0		98,2	97,8	97,7	96,1	0,5	0,5	2,2	

*перед измерением образец подвергали 5 повторяющимся циклам замораживания/размораживания

NA: не измерено

Таблица 30: Оценка стабильности scMATCH3 в концентрации 1 мг/мл, изменение содержания белка с течением времени.

ID белка	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Концентрация белка [мг/мл]				% потери содержания		
			d0	d7	d14	d28	d7	d14	d28

7	PRO250	-80	1,1	1,05	NA	NA	1,02*	NA	NA	3,2*
		4,0		1,05	1,12	1,07	1,01	-6,4	-1,7	3,8
		40,0		1,05	1,11	1,07	1,02	-5,3	-1,7	3,6
8	PRO250	-80	1,0	1,02	NA	NA	0,96*	NA	NA	6,1*
		4,0		1,02	1,10	0,98	0,94	-7,5	3,9	8,0
		40,0		1,02	1,06	1,02	0,97	-4,0	0,3	4,8
9	PRO250	-80	1,0	1,03	NA	NA	0,94*	NA	NA	8,5*
		4,0		1,03	1,05	0,98	0,92	-2,3	4,5	10,3
		40,0		1,03	1,03	1,00	1,09	-0,6	3,0	-6,5
0	PRO251	-80	1,0	1,04	NA	NA	1,05*	NA	NA	-0,6*
		4,0		1,04	1,00	0,97	1,03	3,4	6,5	0,5
		40,0		1,04	0,99	0,93	1,03	5,0	10,2	1,0

*перед измерением образец подвергли 5 повторяющимся циклам замораживания/размораживания

NA: не измерено

[0253] Молекулы, содержащие полученные из 55-38-D07 домены против ROR1 (PRO2507 и PRO2508), и молекулы, содержащие полученные из 55-39-G02 домены против ROR1 (PRO2509 и PRO2510), демонстрируют очень схожую стабильность мономера в течение 28 дней в концентрации 1 мг/мл. Не наблюдали значимого изменения содержания мономера при температурах -80°C и 4°C , а также после повторяющихся циклов замораживания/размораживания (5 раз), что осуществляли в режиме d28/ -80°C перед измерением SE-ВЭЖХ/УФ.

[0254] Анализ электрофореза в ПААГ с SDS в образцах дня 0 (d0) и дня 28 (d28), помимо основной полосы, соответствующей вычисленной молекулярной массе молекул, показал наличие низкомолекулярных (LMW) соединений во всех (восстановленных) образцах в d0 исследования. Причина их возникновения не совсем ясна, однако, это может быть связано с общими, неоптимизированными условиями экспрессии и очистки, используемыми для производства молекул или неблагоприятными условиями подготовки образцов для электрофореза в ПААГ с SDS. При сравнении образцов d28 с образцами d0, как правило, нельзя определить значимого повышения соединений LWM в образцах при 4°C и 40°C с течением времени. Во всех образцах, инкубированных в течение 28 дней в ускоренных условиях (40°C), фракция LMW-соединений очевидно повышалась, что свидетельствует о зависящей от времени и температуры фрагментации молекул scMATCH3. Т.к. все молекулы демонстрирует аналогично благоприятные профили стабильности, отмена отбора молекул на основании данных ускоренного исследования стабильности не предусмотрена.

[0255] PRO2509 и PRO2510 кажутся немногим лучше PRO2507 и PRO2508 в отношении термической стабильности, что оценивают посредством nDSF, т.к. их точка

начала разворачивания (T_{onset}) значительно выше для молекул, содержащих полученный из 55-39-G02 домен ROR1.

Пример 8: Получение и продуцирование мультиспецифических антител MATCH4 против ROR1×CD3×hSA

[0256] ROR1-связывающие домены из молекул scMATCH3 встраивали в формат молекулы MATCH4 для дальнейшего повышения активности с использованием двух ROR1-связывающих доменов. Это будет приводить к бивалентному таргетингу, схожему с общепринятыми полноразмерными антителами, но с дополнительным преимуществом Т-клеточного таргетинга (домен CD3) и увеличения времени полужизни (домен hSA).

[0257] MATCH4 представляет собой формат, разработанный Numab, состоящий исключительно из переменных доменов, соединенных GS-линкерами разной длины, делающими возможным специфическое спаривание только пар совпадающих доменов. Формат MATCH4 можно экспрессировать рекомбинантно в клетках млекопитающих. Для очистки можно использовать стадию общепринятой аффинной хроматографии. Архитектура молекул MATCH4 ND032 показана на фигуре 9. Для этого формата необходимо, чтобы субъединицы димера состояли из пары двух пар отдельных переменных доменов, где каждая соответствующая субъединица обладает двумя доменами VL или двумя доменами VH, расположенными тандемом, таким образом, регулируя гетеродимеризацию двух белковых цепей. Образующие димер тандемные переменные домены на соответствующих цепях MATCH4 организованы в антипараллельную ориентацию N-конец-С-конец, как и противоположная цепь. Обе цепи коэкспрессируют в клетках млекопитающих в полностью функциональные тетраспецифические молекулы. Общепринятые линкеры Gly-Ser между переменными доменами использовали для их соединения. Кроме того, антипараллельный формат MATCH4 поддается встраиванию дисульфидного мостика в один из коровых доменов, как показано на фигуре 9. Дополнительные дисульфидные связи VL/VH можно включать для стабилизации отдельных доменов.

[0258] Экспрессию конструкций MATCH4 млекопитающих осуществляли в масштабе 1 л в Evitria AG (Schlieren, Switzerland) с использованием их собственной экспрессионной системы млекопитающего. Белки очищали из осветленных супернатантов культур посредством аффинной хроматографии с протеином L с последующей SEC в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ сахарозы при pH 6,5. Содержание мономера во фракциях SEC оценивали посредством анализа SE-ВЭЖХ и объединяли фракции с содержанием мономера >95%. Для контроля качества произведенного материала использовали стандартные аналитические способы, такие как SE-ВЭЖХ, UV₂₈₀ и электрофорез в ПААГ с SDS. Молекулярная композиция и производство молекул MATCH4 показаны в таблице 31. Производство молекул MATCH4 PRO2669 и RPO2670, содержащих модифицированные или улучшенные ROR1-, CD3- и hSA-связывающие домены, показано в таблице 32.

Таблица 31: Архитектура молекул MATCH4, конечный титр и чистота

мономера по результатам SE-ВЭЖХ.

PRO ID	Домен 1 (ROR1)	Домен 2 (SA)	Домен 3 (CD3)	Домен 4 (ROR1)	Титр [мг/л культуры]	Конечный титр [мг/л культуры]	Содержание мономера [%] (SEC1/сЕС 2)
PRO2589	55-38-D07-sc02	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc02	129,3	28,8	95,2/96,4*
PRO2590	55-38-D07-sc06	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc06	53,4	23,0	98,3/96,6*
PRO2591	55-39-G02-sc03	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc03	107,4	54,8	89,0/96,4*
PRO2592	55-39-G02-sc06	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc06	125,8	41,7	95,1/NA

*Осуществляли два эксперимента по эксклюзионной хроматографии (SEC) для заключительной очистки, материал которых не объединяли, материал с более высоким содержанием мономера использовали для дальнейшей характеристики молекул

Таблица 32: Производство молекул MATCH4 PRO2669 и RPO2670

ID белка	Формат	Титр захвата [мг/л]	Титр [мг/л]	Чистота по результату м SE-ВЭЖХ [% мономера]	nDSF T _{M1} [°C]	nDSF T _{M2} [°C]
PRO2669	MATCH4	99,1	15,4	98,5	63,1	71,2
PRO2670	MATCH4	50,2	21,0	98,7	61,5	76,2

Пример 9: Фармакодинамическая характеристика молекул MATCH4

9.1. Аффинность связывания по результатам SPR

[0259] Кинетику связывания четырех мультиспецифических молекул MATCH4 с тремя мишенями hROR1, hCD3ε и hSA тестировали посредством SPR.

Аффинность связывания с hROR1 по результатам SPR

[0260] Кинетику связывания (включая аффинность) с авидностью и без нее для

четырёх молекул sMATCH4 в отношении рекомбинантного белка ROR1 человека определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva) с использованием двух разных дизайнов анализа.

[0261] Аффинность связывания без авидности определяли с использованием собственного IgG кролика против каркаса (rIgG21-57-20-B11), иммобилизованного на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) для захвата молекул MATCH4 на поверхности. Серию титров молекулы ROR1 человека (Peprotech 160-054) инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла захвата-инъекция аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (3 М $MgCl_2$) и молекулу MATCH4 снова захватывали с последующими разными концентрациями ROR1 человека. Кинетику связывания с ROR1 человека измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с десятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,088 до 90 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Bioconcept).

[0262] Связывание с авидностью определяли аналогично способам, описанным в разделе 1.6. Молекулы рекомбинантного ROR1 человека (Fc-метка, Acro Biosystems RO1-N5250) ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и инъецировали серию титров каждой молекулы MATCH4 в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0, и 3 М $MgCl_2$) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATCH4. Кинетику связывания с ROR1 человека измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с девятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,088 до 45 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Bioconcept).

[0263] Для обоих анализов кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе Chi2 и U-критерия, являющихся показателями качества аппроксимации кривой. Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0264] Кинетику связывания с hROR1 определяли для четырёх MATCH4 с аффинностями в диапазоне от 5 нМ до 1,2 нМ. Аффинности к hROR1 с авидностью определяли на четырёх молекулах MATCH4, и они находились в диапазоне от 136 пМ до 22 пМ. Результаты SPR обобщены в таблице 33.

Аффинность связывания с hCD3ε по результатам SPR

[0265] Кинетику связывания (включая аффинность) четырёх молекул MATCH4 с рекомбинантным белком внеклеточного домена CD3 эpsilon человека (hCD3ε; His-метка,

SinoBiological) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Рекомбинантные молекулы hCD3ε ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и инъецировали серию титров каждой молекулы MATСН4 в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (глицин, pH 2,0, и 3 М MgCl₂) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATСН4. Кинетику связывания с hCD3ε измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с девятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,088 до 45 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (HEPES-забуференном физиологическом растворе, 0,05% Tween-20, pH 7,5; Biosconcept). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_{d1}) и ассоциации (k_{a1}), константы второй реакции (k_{a2} и k_{d2}) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием двухуровневой модели связывания и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 . Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0266] Кинетику связывания с hCD3ε определяли для четырех MATСН4 с аффинностями в диапазоне от 6,3 нМ до 4,7 нМ (таблица 34). Аффинность к hCD3ε для всех тестируемых молекул MATСН4 была схожей с таковой у родительского scFv 28-21-D09-sc04.

Аффинность связывания с hSA по результатам SPR

[0267] Кинетику связывания (включая аффинность) четырех молекул MATСН4 с сывороточным альбумином человека (hSA; Sigma-Aldrich A3782) определяли посредством анализа SPR с помощью устройства T200 (Biacore, Cytiva). Молекулы сывороточного альбумина человека ковалентно иммобилизовали на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и инъецировали серию титров каждой молекулы MATСН4 в качестве аналита. После каждого цикла инъекций аналита каждый проточный канал на сенсорном чипе подвергали регенерации (импульсные введения глицина, pH 1,5, и 3 М MgCl₂) и инъецировали новую концентрацию молекулы MATСН4. Кинетику связывания с hSA измеряли с использованием многоциклового анализа кинетики с десятью концентрациями аналита в диапазоне от 0,18 до 90 нМ, разведенными 1:2 в подвижном буфере (PBS-P+ pH 5,5, PBS до pH 5,5 с HCl, 0,05% Tween20). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли с помощью аналитического программного обеспечения Biacore (программного обеспечения Biacore Evaluation версии 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 и качество аппроксимации подвергали мониторингу на основе χ^2 и U-критерия, являющихся показателями качества аппроксимации кривой. Уровень связывания вычисляли как максимальную достигаемую стабильность связывания, нормализованную по теоретическому R_{max} .

[0268] Кинетику связывания с hSA определяли для четырех MATCH4 с аффинностями в диапазоне от 6,7 нМ до 5,5 нМ (таблица 35). Аффинность к hSA для всех тестируемых молекул MATCH4 была схожей с таковой у родительского scFv 19-04-A10-sc02.

9.2. Связывание клеток молекулами MATCH4 с ROR1 человека по результатам проточной цитометрии

[0269] Связывание клеток молекулами MATCH4 против ROR1 (PRO2589, PRO2590, PRO2591, PRO2592 и PRO2658) с ROR1-экспрессирующими клетками MDA-MB-231 анализировали посредством проточной цитометрии, как описано выше. В кратком изложении, подготавливали 5-кратные серийные разведения молекул MATCH4, начиная с 120 нМ, а также референсного Fab-фрагмента PRO2213, начиная с концентрации 120 нМ, а затем добавляли на планшеты с клетками. После инкубации при 4°C в течение 1 ч. в присутствии 1 мг/мл сывороточного альбумина человека (hSA) планшеты промывали и инкубировали со специфическими детекторными антителами. Интенсивность флуоресценции по каналу APC регистрировали для каждого образца с использованием проточного цитометра NovoCyte 2060 и вычисляли геометрическое среднее интенсивности флуоресценции MFI.

[0270] Связывание молекул MATCH4 с ROR1 человека на плазматической мембране оценивали посредством проточной цитометрии. Вычисленные значения EC_{50} , относительной EC_{50} , а также относительного максимального связывания, полученные в этих экспериментах, приведены в таблице 36. Fab-фрагмент PRO2213 использовали в качестве референсного антитела против ROR1. Все молекулы MATCH4 демонстрировали связывание с ROR1-положительными клетками MDA-MB-231, в то время как не наблюдали связывания с ROR1-отрицательными клетками MCF-7 (см. фигуру 10). EC_{50} связывания молекул MATCH4, несущих клон против ROR1 55-38-D07 (PRO2589 и PRO2590), повышалась в 10 раз по сравнению со значениями EC_{50} соответствующих молекул scMATCH3. Например, относительная EC_{50} PRO2589 составляет 0,45, что в приблизительно десять раз лучше относительной EC_{50} scMATCH3 PRO2507 (0,03). Аналогично, EC_{50} связывания молекул MATCH4, несущих клон против ROR1 55-39-G02 (PRO2591 и PRO2592), повышалась в 5 раз (ср. относительную EC_{50} PRO2592 с относительной EC_{50} PRO2557). Полагают, что повышение связывания является результатом бивалентной природы молекул MATCH4, что приводит к эффектам в отношении avidности. Среди молекул MATCH4, PRO2591 (домен против ROR1: 55-39-G02-sc03) демонстрировало лучшую EC_{50} связывания, в приблизительно в 2,5 лучше референсного Fab-фрагмента PRO2213. Оптимизированный вариант PRO2590, PRO2670, измеряли посредством проточной цитометрии в тех же экспериментальных условиях. В этом эксперименте авторы настоящего изобретения обнаружили, что PRO2670 связывается с клетками MDA-MB-231 с активностью, сравнимой с PRO2590, о чем свидетельствует схожее значение относительной EC_{50} .

[0271] В совокупности, все молекулы MATCH4 демонстрировали специфическое

связывание с экспрессирующими ROR1 человека клетками, и обнаружили более высокое связывание в случае молекул, несущих клон против ROR1 55-39-G02, по сравнению с серией молекул, сконструированных с использованием клона против ROR1 55-38-D07. Вероятно, из-за эффектов в отношении avidности, все бивалентные молекулы MATCH4 демонстрировали повышенную EC_{50} связывания по сравнению с соответствующими моновалентными молекулами scMATCH3.

Таблица 33: Обобщение измерения аффинности к hROR1 в случае молекул MATCH4 с авидностью и без нее.

#ID белка	Описание белка	Аффинность/ авидность	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
PRO2589	55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Аффинность	9,4E+04	1,1E-04	1,2E-09
PRO2590	55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Аффинность	5,9E+04	1,7E-04	2,9E-09
PRO2591	55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Аффинность	1,1E+05	3,4E-04	3,2E-09
PRO2592	55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Аффинность	9,8E+04	4,9E-04	5,0E-09
PRO2669	55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	Аффинность	5,66E+04	<1,00E-05	1,77E-10
PRO2670	55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	Аффинность	4,60E+04	1,32E-04	2,87E-09

PRO2589	55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Авидность	7,55E+05	7,02E-05	9,30E-11
PRO2590	55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Авидность	4,53E+05	6,15E-05	1,36E-10
PRO2591	55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Авидность	1,81E+06	4,10E-05	2,27E-11
PRO2592	55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	Авидность	1,98E+06	5,69E-05	2,87E-11
PRO2669	55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	Авидность	1,0E+06	2,6E-05	2,6E-11
PRO2670	55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	Авидность	7,6E+05	8,1E-05	1,1E-10

Таблица 34: Обобщение измерения аффинности к hCD3ε для выбранных молекул MATCH4.

# белка	Описание белка	k_{a1} (1/Мс)	k_{d1} (1/с)	k_{a2} (1/с)	k_{d2} (1/с)	K_D (М)
---------	----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	-----------

PRO2589	55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	4,4E+05	6,5E-03	6,3E-03	4,2E-03	5,9E-09
PRO2590	55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	4,5E+05	5,8E-03	5,5E-03	4,3E-03	5,7E-09
PRO2591	55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	4,2E+05	4,23E-03	2,7E-03	2,4E-03	4,7E-09
PRO2592	55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	4,3E+05	5,5E-03	3,6E-03	3,6E-03	6,3E-09
PRO2669	55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	8,1E+05	4,7E-03	5,6E-03	4,7E-03	2,7E-09
PRO2670	55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	8,2E+05	4,8E-03	5,4E-03	4,7E-03	2,7E-09

Таблица 35: Обобщение измерения аффинности к hSA для выбранных молекул MATCH4.

#ID белка	Описание белка	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)
-----------	----------------	--------------	-------------	-----------

PRO2589	55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	3,3E+05	1,8E-03	5,5E-09
PRO2590	55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	2,9E+05	2,0E-03	6,7E-09
PRO2591	55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	3,3E+05	1,9E-03	5,6E-09
PRO2592	55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH	3,6E+05	2,3E-03	6,3E-09
PRO2669	55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	4,1E+05	1,3E-03	3,0E-09
PRO2670	55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH	3,7E+05	1,3E-03	3,5E-09

Таблица 36: Связывание бивалентных молекул MATCH4 против ROR1 PRO2589, PRO2590, PRO2591, PRO2592 и PRO2670 с ROR1 человека, экспрессируемым на клетках MDA-MB-231, по результатам проточной цитометрии.

ID PRO	Домен 1 (ROR1)	Домен 2 (hSA)	Домен 3 (CD3)	Домен 4 (ROR1)	EC ₅₀ [нМ]	Отн. EC ₅₀ (EC ₅₀ , PRO2213/EC ₅₀ , MATCH4)	Отн. максимальное связывание (MFI _{MATCH4} /MFI _{PRO2213})
PRO2589	55-38-D07-sc02	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc02	1,55	0,45	2,67

PRO2590	55-38-D07-sc06	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-38-D07-sc06	1,23	0,56	2,76
PRO2591	55-39-G02-sc03	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc03	0,28	2,45	2,21
PRO2592	55-39-G02-sc06	19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06)	28-21-D09-sc04	55-39-G02-sc06	0,72	0,94	2,41
PRO2670	55-38-D07-sc06	19-04-A10-sc02(RTQ) diS (19-04-A10-sc06(RTQ))	28-21-D09-sc04(RTQ)	55-38-D07-sc06(RTQ)	0,85	0,39	2,68

9.3. Цитотоксичность в отношении клеток-мишеней и активация Т-клеток, опосредованная молекулами MATCH4

[0272] Осуществляли серию анализов цитотоксичности для сравнения активностей и профилей активации Т-клеток основными кандидатами для понимания способности молекул MATCH4 способствовать уничтожению опухолевых клеток и активации CD8 Т-клеток.

[0273] Во-первых, уровни экспрессии ROR1 на нескольких линиях клеток тестировали параллельно. В кратком изложении, клетки инкубировали последовательно с Zombie NIR live/dead APC-Cy7 (Biolegend, 1:500) при 4°C в течение 20 минут с последующей стадией промывки, в затем с PE-конъюгированным антителом против ROR1 (Biolegend, 1:25) при 4°C в течение 20 минут с последующей промывкой и подсчетом с помощью проточного цитометра Attune (ThermoFisher Scientific). Измеренная поверхностная экспрессия ROR1 на клетках MDA-MB-231, Jeko-1, JIMT-1, SKOV-3 и MCF7 показана на фигуре 11. Наибольшие уровни ROR1 обнаружили на клетках MDA-MB-231 и Jeko-1. Клетки JIMT-1 и SKOV-3 демонстрировали низкие уровни экспрессии ROR1, и клетки MCF7 демонстрировали очень низкий уровень экспрессии ROR1. Таким образом, клетки MCF7 использовали в качестве отрицательного контроля для ROR1.

[0274] Анализы цитотоксичности осуществляли с использованием пан-Т-клеток, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных из лейкоцитарных пленок. PBMC выделяли с использованием пробирок SepMate с Lymphoprep (StemCell Technologies) для создания градиента плотности по рекомендациям производителя. После выделения PBMC пан-Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения пан-Т-клеток от Miltenyi по рекомендациям производителя.

[0275] Выделенные пан-Т-клетки сокультивировали в течение 40 часов с интересующими ROR1-положительными и -отрицательными опухолевыми клетками при соотношении эффектор:мишень 10:1. После сокультивирования 100 мкл супернатанта аспирировали для тестирования на высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из умирающих клеток с использованием набора для детекции цитотоксичности от Roche. Оставшийся супернатант замораживали при -80°C для последующего мультиплексного анализа цитокинов. Оставшиеся клетки метили следующими реагентами или антителами (все от Biolegend): фиксируемый краситель Live/Dead Aqua, APC-Cy7-конъюгированное антитело против CD4 человека (клон ОКТ4), PE-Cy7-конъюгированное антитело против CD11c человека (клон Bu15), PerCP-Cy5.5-конъюгированное антитело против CD8 человека (клон SK1) и PE-конъюгированное антитело против CD69 человека (клон FN50). Клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра (Attune, ThermoFisher Scientific) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD) на положительную регуляцию CD69 в качестве показателя активации CD4 и CD8 Т-клеток.

[0276] Все тестируемые молекулы MATCH4 приводили к специфическому уничтожению положительных клеток с высоким ROR1, таких как MDA-MB-231 и Jeko-1 (см. фигуру 12A), и наблюдали активность от минимальной до отсутствующей в отношении

ROR1-отрицательных клеток MCF7 (см. фигуру 12B). Значения EC_{50} молекул MATCH4 превосходили соответствующие scMATCH3 (PRO2589 и PRO2590 против PRO2507, PRO2591 и PRO2592 против PRO2557/PRO2510). Однако, в случае клеток с низкой экспрессией ROR1, то есть JIMT-1 и SKOV-3 (фигура 12A, внизу), PRO2589 и PRO2590 (домен ROR1, полученный из PRO2060), по-видимому, имели в некоторой степени превосходящие значения EC_{50} по сравнению с PRO2591 и PRO2592 (домен ROR1 PRO2271). Полученные из PRO2060 молекулы MATCH4 также, по-видимому, демонстрируют в некоторой степени превосходящие значения EC_{50} по сравнению с молекулой scMATCH3 PRO2507 в отношении клеток с низкой экспрессией ROR1, в то время как это различие, по-видимому, отсутствовало при сравнении полученных из PRO2271 MATCH4 и молекул scMATCH3. Примечательно, что на клетках, экспрессирующих низкие уровни ROR1 молекулы MATCH4, по-видимому, демонстрируют общее более низкое максимальное уничтожение по сравнению с молекулами scMATCH3 (фигура 12A, внизу). Результаты анализов цитотоксичности обобщены в таблице 37.

[0277] Кроме того, исследовали активацию Т-клеток, измеряемую по повышению доли клеток, экспрессирующих CD69. Активацию Т-клеток на основе CD8 (фигура 13, сверху) и CD4 (фигура 13, внизу) отслеживали очень тщательно с данными о цитотоксичности. наибольшие доли активированных CD8 и CD4 Т-клеток получали в случае клеток MDA-MB-231, которые также экспрессируют наибольшие уровни ROR1 (фигура 13A). Молекулы MATCH4 на основе PRO2060 имеют более низкие значения EC_{50} по сравнению с молекулами MATCH4 на основе PRO2271. Однако эти популяции Т-клеток имели в целом более высокие доли активированных клеток при исследовании молекул scMATCH3 по сравнению с молекулами MATCH4. Результаты обобщены в таблицах 38 и 39.

[0278] Наибольшее различие активности молекул MATCH4, по-видимому, имеет место в случае клеток с низкой экспрессией ROR1, то есть клеток SKOV-3 и JIMT-1. По причине ожидаемой гетерогенности уровней экспрессии ROR1 между пациентами и среди опухолевых заболеваний, благоприятным будет эффективный таргетинг опухолей с более низкими уровнями экспрессии ROR1. Учитывая эти данные, оказывается, что PRO2592 имеет наименьшие активности (цитотоксичность и активацию Т-клеток), а также наименьшие максимальные значения.

9.4. Биофизическая характеристика основных молекул MATCH4

Стабильность при хранении и температура плавления

[0279] Молекулы MATCH4 подвергали 14-дневному исследованию стабильности, в котором молекулы составляли в водном буфере (50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ сахарозы при pH 6,5) в количестве 1 мг/мл и хранили при $< -80^{\circ}C$, $4^{\circ}C$ и $40^{\circ}C$ в течение 14 дней. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 40 обобщены содержание мономера в % и % потери мономера относительно дня 0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством

измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования, и они приведены в таблице 41. Термическую стабильность анализировали посредством nDSF (NanoTemper) определяя точку начала разворачивания (T_{onset}) и среднюю точку разворачивания (T_m). Результаты анализа T_m приведены в таблице 40.

[0280] Все четыре молекулы MATCH4 демонстрируют исключительные профили стабильности и не демонстрируют значимых потерь содержания мономера или потерь содержания белка после 14 дней инкубации. Не отмечали значимого изменения содержания мономера при температурах -80°C и 4°C , а также после повторяющихся циклов замораживания-размораживания (5 раз), осуществляемых с образцом день 14/ -80°C перед измерением SE-ВЭЖХ/УФ.

Пример 10: Анализ связывания уже существующих ADA

10.1. общий способ анализа:

[0281] Способ разработали в Numab для детекции уже существующих антител против лекарственного средства в сыворотке человека с использованием прямого формата анализа.

[0282] 96-луночные планшеты с половинным объемом лунок покрывали 100 нг/мл тестируемой молекулы (MATCH3 или формата scFv) в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью PBS, содержащего 0,2% Tween и 1% BSA. Затем отдельные сыворотки человека добавляли в разведении 1:20 (5% сыворотки) или 1:100 (1% сыворотки) недополненными (скрининговый анализ) или дополненными (подтверждающий анализ) с использованием той же молекулы, что и покрытие в соответствующей лунке. Концентрация добавки находилась в диапазоне от 60 до 115 нМ, и дополненные образцы преинкубировали в течение 1 часа. Затем антитела, связанные с молекулами, покрывающими планшет, определяли с использованием 100 нг/мл HRP-конъюгированного антитела кролика против IgG человека в течение 1 часа. Субстрат ТМВ добавляли в качестве субстрата и после кратковременной инкубации ферментативную реакцию останавливали с помощью 1 М HCl. Оптическую плотность каждой лунки считывали при 450 нм. Все стадии осуществляли при комнатной температуре. Между каждыми стадиями планшеты промывали три раза 450 мкл промывочного буфера. За исключением стадий блокирования и промывки, все компоненты анализа добавляли в объеме 25 мкл/лунку и использовали две параллели. Для стадии инкубации планшеты ELISA помещали на вращающийся смеситель (40 об./мин.).

Как правило, первый раунд измерения осуществляли с использованием недополненных сывороток человека (скрининговый анализ). Затем вычисляли пороговую точку скрининга (SCP) для каждого планшета. Недополненные образцы с сигналом ниже SCP обозначали как "скрининг-отрицательные" и не учитывали их при подтверждающем анализе. Недополненные образцы с сигналом выше SCP обозначали как "скрининг-положительные".

Таблица 37: Обобщение ключевых данных о цитотоксичности, полученных с использованием пан-Т-клеток для MATCH4 и выбранных молекул scMATCH3

ID PRO	Формат	Домен 3, положение scFv (ROR1)	Средн. EC₅₀ (нМ) цитотоксичности (MDA-MB-231)	Средн. % макс. лизиса (MDA-MB-231)	Средн. EC₅₀ (нМ) CD8 T-клеток акт. (MDA-MB-231)	Средн. EC₅₀ (нМ) цитотоксичности (SKOV3)	Средн. % макс. лизиса (SKOV3)	Средн. EC₅₀ (нМ) CD8 T-клеток акт. (SKOV3)	Средн. EC₅₀ (нМ) цитотоксичности (JIMT-1)	Средн. % макс. лизиса (JIMT-1)
PRO2589	MATCH4	PRO2060	0,015	56,9	0,012	0,043	54,6	0,031	0,10	41
PRO2590	MATCH4	PRO2291 (PRO2060+dis)	0,016	52,2	0,013	0,049	51,8	0,034	0,13	38,6
PRO2591	MATCH4	PRO2271	0,011	47,2	0,010	3,5	58,7	0,68	2,4	34,5
PRO2592	MATCH4	PRO2271+dis	0,008	47,1	0,011	5,37	44,7	1,6	3,3	24,9
PRO2507	scMATCH3	PRO2060	0,47	64,6	0,36	0,42	79,1	0,34	2.	63,9
PRO2510	scMATCH3	PRO2062	0,14	65,5	0,087	0,25	83,1	0,19	1,1	72,1
PRO2557	scMATCH3	PRO2271+dis	0,74	78,2	0,52	1,3	88	1,2	3,4	83

Таблица 38: Обобщение данных об активации CD8 Т-клеток из анализов цитотоксичности с использованием выбранных MATCH4 и выбранных молекул scMATCH3

ID белка	Формат	Домен ROR1	Средн. EC₅₀ (нМ) CD8 Т-клеток акт. (MDA-MB-231) n=3-5	Средн. % макс. CD8 Т-клеток акт. (MDA-MB-231)	Средн. EC₅₀ (нМ) CD8 Т-клеток акт. (SKOV3) n=2-3	Средн. % макс. CD8 Т-клеток акт. (SKOV3)	Средн. EC₅₀ (нМ) CD8 Т-клеток акт. (JIMT-1) n=3-5	Средн. % макс. CD8 Т-клеток акт. (JIMT-1)
PRO2589	MATCH4	55-38-D07-sc02	0,012	68,5	0,032	66,7	0,08	23,8
PRO2590	MATCH4	55-38-D07-sc06	0,013	68,8	0,034	63,7	0,09	22,5
PRO2591	MATCH4	55-39-G02-sc03	0,010	67,5	0,68	62,7	4,6	20,3
PRO2592	MATCH4	55-39-G02-sc06	0,011	67	1,6	54,7	9,8	15,5
PRO2507	scMATCH3	55-38-D07-sc02	0,36	68	0,34	64,3	2,9	40,8
PRO2510	scMATCH3	55-39-G02-sc05	0,087	70,4	0,19	79,3	1,1	47,6
PRO2557	scMATCH3	55-39-G02-sc06	0,52	65,3	1,2	81,5	5,4	48,7

Таблица 39: Обобщение данных об активации CD4 Т-клеток из анализов цитотоксичности с использованием выбранных

MATCH4 и выбранных молекул scMATCH3

ID белка	Формат	Домен ROR1	Средн. EC ₅₀ (нМ) CD4 T- клеток акт. (MDA-MB-231) n=3-5	Средн. % макс. CD4 T- клеток акт. (MDA-MB- 231)	Средн. EC ₅₀ (нМ) CD4 T клеток акт. (SKOV3) n=2-3	Средн. % макс. CD4 T- клеток акт. (SKOV3)	Средн. EC ₅₀ (нМ) CD4 T- клеток акт. (JIMT-1) n=3-5	Средн. % макс. CD4 T- клеток акт. (JIMT-1)
PRO2589	MATCH4	55-38-D07-sc02	0,006	79	0,02	80,3	0,09	36,7
PRO2590	MATCH4	55-38-D07-sc06	0,007	79,3	0,02	78,3	0,11	35,3
PRO2591	MATCH4	55-39-G02-sc03	0,005	80,3	0,38	78,7	3,9	30,5
PRO2592	MATCH4	55-39-G02-sc06	0,005	79	0,76	75	9,1	23
PRO2507	scMATCH 3	55-38-D07-sc02	0,14	81,8	0,22	83,3	2,4	63,2
PRO2510	scMATCH 3	55-39-G02-sc05	0,036	82	0,13	87,3	0,8	68
PRO2557	scMATCH 3	55-39-G02-sc06	0,20	77,7	0,55	87,5	3,3	69,3

Таблица 40: Оценка стабильности MATCH4 в концентрации 1 мг/мл, изменение содержания мономера с течением времени.

ID белка	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Содержание мономера [%]*				% потери содержания мономера			nDSF (NanoTemper)
			d0	d1	d7	d14	d1	d7	d14	T _m [°C]
PRO2589	-80	1,02	96,2	NA	NA	97,1*	NA	NA	-0,9*	
	4		96,2	96,6	96,9	98	-0,5	-0,7	-1,9	62,0

	40		96,2	96,4	96,9	97,1	-0,2	-0,7	-0,9	
PRO2590	-80	1,06	98,9	NA	NA	99,2*	NA	NA	-0,2*	
	4		98,9	98,9	99,0	99	0,0	-0,1	-0,1	62,9
	40		98,9	99,1	98,7	98,5	-0,2	0,2	0,5	
PRO2591	-80	1,09	94,2	NA	NA	95,6*	NA	NA	-1,4*	
	4		94,2	95,2^	96,4^	96,8^	-1,1^	-2,3^	-2,7^	55,0
	40		94,2	97,4^	97,5^	95,1^	-3,4^	-3,5^	-1^	
PRO2592	-80	1,06	96,8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	4		96,8	96,9	97,6	97,8	-0,1	-0,8	-1	58,4
	40		96,8	97,1	96,8	97,1	-0,3	0,0	-0,3	

*перед измерением образец подвергали 5 повторяющимся циклам замораживания/размораживания

^значительное повышение содержания мономера по сравнению с d0 исследования, может являться результатом разведения исходного образца с более высокой концентрацией до исследуемой концентрации 1 мг/мл

NA: не измерено, ND: неопределимо

Таблица 41: Оценка стабильности MATCH4 в концентрации 1 мг/мл, изменение содержания белка с течением времени.

ID белка	Температура [°C]	Концентрация [мг/мл]	Концентрация белка [мг/мл]				% потери содержания		
			d0	d1	d7	d14	d1	d7	d14
PRO2589	-80	1,02	1,0	NA	NA	1,0*	NA	NA	1,2*
	4		1,0	1,0	1,0	1,1	-1,1	5,9	-11,1
	40		1,0	0,9	1,0	1,1	10,6	6,6	-12,8
PRO2590	-80	1,06	1,1	NA	NA	1,0*	NA	NA	3,9*
	4		1,1	1,0	1,0	1,1	1,4	8,7	-4,3
	40		1,1	1,0	1,1	1,1	1,9	-6,5	-2,9

PRO2591	-80	1,09	1,1	NA	NA	1,0*	NA	NA	5,9*
	4		1,1	1,0	1,1	1,1	5,2	-2,2	0,1
	40		1,1	1,0	1,1	1,1	5,9	0,0	3,2
PRO2592	-80	1,06	1,1	NA	NA	1,0*	NA	NA	6,6*
	4		1,1	1,0	1,0	1,0	6,2	2,6	7,3
	40		1,1	1,0	1,0	1,0	6,9	5,3	6,1

*перед измерением образец подвергали 5 повторяющимся циклам замораживания/размораживания

[0283] Используя большинство из этих "скрининг-положительных" образцов осуществляли второй раунд измерения с помощью дополненных сывороток человека (подтверждающий анализ) для определения того, является ли исходно определенное связывание антител в соответствующих образцах сывороток специфическим для тестируемой молекулы. Снижение сигнала поглощения в дополненных лунках свидетельствует о том, что сигнал, наблюдаемый в недополненной лунке в исходном скрининговом анализе, является специфическим для молекулы, которой покрыт планшет. Полученный процент ингибирования (% ингибирования), необходимый для подтверждения специфичности, устанавливали на 20-30% или вычисляли пороговое значение подтверждения в процентах (%ССР). В последнем случае только образцы, в которых процент ингибирования превышает ССР, подтверждали как положительные. % ингибирования вычисляли как снижение исходного сигнала, полученного для недополненной сыворотки (скрининговый анализ), следующим образом: $\%ССР = \frac{\text{исходный сигнал} - \text{сигнал в недополненной сыворотке}}{\text{исходный сигнал}} \times 100$.

[0284] В альтернативном способе исходный скрининговый анализ не проводили. Вместо этого, тестируемые образцы напрямую анализировали способом подтверждающего анализа. Однако, для анализа данных осуществляли те же вычисления, которые по меньшей мере включают вычисление SCP и %ССР.

10.2. Определение/вычисление пороговой точки скрининга (SCP), нормировочного множителя (NF) и плавающей пороговой точки (FCP)

[0285] Для каждого тестируемого соединения анализировали 40 отдельных образцов сыворотки человека здоровых индивидуумов, неподвергнутых лечению. В других случаях анализировали 20 отдельных образцов сыворотки человека здоровых индивидуумов, неподвергнутых лечению.

Пороговая точка скрининга (SCP):

[0286] Пороговая точка скрининга (SCP) является пороговым значением, при котором сигнал считают положительным (скрининг-положительным). Ее вычисляют так, чтобы включать 5% ложноположительных сывороток.

[0287] Пороговую точку скрининга (SCP) вычисляют следующим образом:

$$SCP = \text{средний } N + 1,645 \times SDN$$

Где:

- "Средний N" соответствует среднему сигналу от всех недополненных отдельных сывороток, измеренных для конкретного тестируемого соединения;

- "SDN" соответствует стандартному отклонению, вычисленному для всех недополненных отдельных сывороток, измеренных на конкретное тестируемое соединение.

Нормировочный множитель (NF):

[0288] Нормировочный множитель (NF) вычисляют следующим образом:

$$NF = SCP - \text{среднее для отрицательного контроля}$$

Где:

- "SCP" является такой, как определено выше; и

- "среднее для отрицательного контроля" соответствует среднему сигналу из отрицательных контролей (объединенные отдельные сыворотки человека, одинаковые на каждом планшете), анализируемых в двух параллелях (то есть 2 лунках) на планшет.

[0289] При вычислении нормировочного множителя необходимо учитывать по меньшей мере два образца NC (то есть 4 лунок).

Вычисление плавающей пороговой точки (FCP):

[0290] После определения SCP и NF плавающую пороговую точку (FCP) для каждого планшета использовали в качестве референсной пороговой точки. В FCP учитывают вариабельность анализа для каждого аналитического эксперимента посредством нормализации SCP с отрицательными контролями на планшете. FCP вычисляют для каждого аналитического эксперимента следующим образом:

$$FCP = NF + \text{средний NC}$$

Где:

- "средний NC" относится к среднему сигналу в образцах отрицательного контроля;
- "NF" относится к нормировочному множителю, как определено выше.

10.3. результаты анализа связывания уже существующих ADA для улучшенных вариантов мультиспецифического антитела:

[0291] Варианты PRO2668 и PRO2669 и, для сравнения, соответствующие немодифицированные референсы PRO2510 и PRO2589 измеряли на их иммуногенные свойства с использованием анализа связывания уже существующих ADA, описанного выше. Измерения напрямую осуществляли в условиях подтверждающего анализа с использованием 20 образцов сывороток человека (19 в случае PRO2589).

[0292] Затем скрининг-положительные сыворотки дополнительно анализировали, учитывая % ССР 30%. Количество положительных образцов сыворотки для каждой тестируемой молекулы приведено в таблице 42. Графики уровней поглощения уже существующих ADA в сыворотке человека, а также снижение уровня поглощения для дополненной сыворотки человека (ингибирование связывания ADA) в случае PRO2741 и референсного PRO2660 показаны на фигуре 14.

Таблица 42: Количество положительных образцов сыворотки выше 30% ССР PRO2668 и PRO2669 и референсных PRO2510 и PRO2589:

№ PRO	Количество положительных образцов сыворотки выше 30% ССР	% положительных из всех тестируемых образцов сыворотки
PRO2668	0	0
PRO2510	3	15
PRO2669	1	5

PRO258 9	10	52,6
-------------	----	------

Пример 11: Цитотоксичность в отношении клеток-мишеней и активация Т-клеток, опосредованная scMATCH3 и вариантами MATCH4 PRO2667, PRO2668, PRO2669 и PRO2670

Способы

[0293] Эти анализы осуществляли с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, выделенных из лейкоцитарных пленок с использованием пробирок SepMate с Lymphoprep (StemCell Technologies) для создания градиента плотности по рекомендациям производителя. Пан-Т-клетки выделяли из PBMC с использованием набора для выделения пан-Т-клеток от Miltenyi Biotec по рекомендациям производителя.

[0294] Выделенные пан-Т-клетки сокультивировали в течение 40 часов с интересующими ROR1-положительными и -отрицательными опухолевыми клетками при соотношении эффектор:мишень 10:1 для адгезивных клеток или 5:1 для клеток в суспензии. После сокультивирования 100 мкл супернатанта аспирировали для тестирования на высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из умирающих клеток с использованием набора для детекции цитотоксичности от Roche. Оставшийся супернатант замораживали при -80°C для последующего мультиплексного анализа цитокинов. Клетки метили следующими реагентами или антителами (все от Biolegend) для анализа проточной цитометрии специфической активации Т-клеток: фиксируемый краситель Live/Dead Aqua, APC-Cy7-конъюгированное антитело против CD4 человека (клон ОКТ4), PE-Cy7-конъюгированное антитело против CD11c человека (клон Bu15), PerCP-Cy5.5-конъюгированное антитело против CD8 человека (клон SK1) и PE-конъюгированное антитело против CD69 человек а(клон FN50). Клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра (Attune, ThermoFisher Scientific) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD) на положительную регуляцию CD69 в качестве показателя активации CD4 и CD8 Т-клеток.

результаты

[0295] Использование всех тестируемых молекул scMATCH3 (PRO2667 и PRO2668) и MATCH4 (PRO2669 и PRO2670) приводило к специфическому уничтожению ROR1-положительных клеток MDA-MB-231 и JIMT-1, как показано на фигуре 15А. Активность молекул MATCH4 превосходила таковую у молекул scMATCH3, однако уровень максимального лизиса, достигаемый в отношении клеток JIMT-1 с более низкой экспрессией ROR1, был выше при использовании молекул scMATCH3. Схожие результаты получали при исследовании активации CD8 Т-клетка, о чем свидетельствует доля CD69-экспрессирующих CD8 Т-клеток (фигура 15В).

Пример 12: Активность PRO2668 в индуцировании специфического, опосредованного Т-клетками лизиса ROR1-положительных линий клеток солидных злокачественных новообразований и гемобластозов

[0296] Цитотоксичность, опосредованную PRO2668, оценивали с помощью линий клеток, представляющих солидные злокачественные новообразования (фигура 16А и 16В) и гемобластозы (фигура 16С). Цитотоксичность наблюдали при использовании ROR1-положительных линий клеток в качестве мишеней, в то время как ROR1-отрицательная линия HCC1954 не лизировалась, что свидетельствует о зависимости PRO2668 от ROR1 (фигура 16А). Активность специфического лизиса, в целом, улучшалась с повышением плотности ROR1 (фигура 16В). Также наблюдали специфическое уничтожение линий лимфомы из клеток мантийной зоны Mino и Z-138 (фигура 16С). Эти данные свидетельствуют о том, что PRO2668 может опосредовать специфическое уничтожение диапазона ROR1-экспрессирующих линий опухолевых клеток.

Пример 13: Активность PRO2668 в опосредовании ROR1-зависимой активации и пролиферации CD8 Т-клеток

Способы

[0297] Выделенные здоровые пан-Т-клетки метили CellTrace Violet по рекомендациям производителя и сокультивировали в течение 3-6 дней с ROR1-положительными опухолевыми клетками при соотношении эффектор:мишень 5:1. Через 3 и/или 6 дней сокультивирования клетки метили следующими реагентами или антителами (все от Biolegend) для анализа проточной цитометрии специфической активации Т-клеток: фиксируемый краситель Live/Dead Aqua, APC-Cy7-конъюгированное антитело против CD4 человека (клон ОКТ4), PE-конъюгированное антитело против CD19 человека (клон Н1В19), PerCP-Cy5.5-конъюгированное антитело против CD8 человека (клон SK1), Alexa Fluor 488-конъюгированное антитело против CD3 человека (клон ОКТ3) и BV650-конъюгированное антитело против CD25 человека (клон BC96). Клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра (Attune, ThermoFisher Scientific) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD). Делящиеся клетки имели сниженный уровень флуоресценции по сравнению с неделящимися клетками (разведение красителя). Положительную регуляцию доли CD25 использовали в качестве показателя активации CD8 Т-клеток.

Результаты

[0298] Активацию CD8 Т-клеток наблюдали после сокультивирования с ROR1-экспрессирующими линиями рака молочной железы MDA-MB-231 и JMT-1 (фигура 17А). Степень активации, по-видимому, коррелирует с экспрессией ROR1, т.к. более высокую долю активированных Т-клеток наблюдали в случае более высокой экспрессии ROR1. Наблюдали пролиферацию CD8 Т-клеток в ответ на ROR1-экспрессирующие линии клеток при исследовании долей делящихся клеток (клетки со сниженной флуоресценцией CellTrace Violet) или количеств делящихся клеток на микролитр. Степень пролиферации была выше при использовании мишеней с более высокой экспрессией ROR1. Активацию и пролиферацию CD8 Т-клеток также наблюдали в ответ на линию лимфомы из клеток мантийной зоны Z-138 (фигура 17В). Эти данные свидетельствуют о том, что вовлечение ROR1-экспрессирующих мишеней и Т-клеток с PRO2668 приводит к активации и

пролиферации Т-клеток.

Пример 14: Активность PRO2668 в опосредовании специфического лизиса немитотических образцов от пациентов с первичным CLL человека с низкой экспрессией ROR1

Способы

[0299] Эти анализы осуществляли с использованием образцов от пациентов с CLL (IQBiosciences) и пан-Т-клеток здоровых людей, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок с использованием пробирок SepMate с Lymphoprep (StemCell Technologies) для создания градиента плотности по рекомендациям производителя. Пан-Т-клетки выделяли из PBMC с использованием набора для выделения пан-Т-клеток от Miltenyi Biotec по рекомендациям производителя.

[0300] Образцы от пациентов с CLL оценивали по их способности делиться посредством исследования включения 5-этинил-2'-дезоксисуридина (EdU) с использованием набора для анализа проточной цитометрии Click-It Plus по рекомендациям производителя. Делящиеся клетки положительно метили по сравнению с неделящимися клетками. Плотность рецепторов оценивали указанным выше способом, например, как указано в разделе 9.3. Связывание клеток PRO2668 оценивали посредством титрования увеличивающихся концентраций PRO2668 в присутствии сывороточного альбумина человека с последующей интенсивной промывкой и детекцией с помощью флуоресцентно меченого вторичного реагента, созданного для детекции каркаса. Образцы подсчитывали с помощью проточного цитометра и анализировали с использованием FlowJo.

[0301] Выделенные пан-Т-клетки сокультивировали в течение 40 часов с образцами от пациентов с CLL при соотношении эффектор:мишень 5:1. После сокультивирования оставшийся супернатант замораживали при -80°C для последующего мультиплексного анализа цитокинов. Клетки метили следующими реагентами или антителами (все из Biolegend) для анализа проточной цитометрии гибели клеток и специфической активации Т-клеток: фиксируемый краситель Live/Dead Aqua, APC-Cy7-конъюгированное антитело против CD4 человека (клон ОКТ4), Alexa Fluor 488-конъюгированное антитело против CD3 человека (клон ОКТ3), PerCP-Cy5.5-конъюгированное антитело против CD8 человека (клон SK1) и BV650-конъюгированное антитело против CD69 человека (клон FN50), BV421-конъюгированное антитело против CD19 человека (клон SJ25C1), APC-конъюгированное антитело против аннексина V, PE-конъюгированное антитело против ROR1 человека (клон 2A2). Клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра (Attune, ThermoFisher Scientific) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (BD) на положительную регуляцию CD69, как показателя активации CD4 и CD8 Т-клеток. Умиравшие клетки CLL гейтировали как CD19⁺ аннексин V⁺ L/D⁺. Высвобождение цитокинов оценивали с помощью замороженных супернатантов с использованием набора для мультианалитического анализа проточной цитометрии LEGENDplex™, 13-плексной панели для анализа иммунного ответа человека по рекомендациям производителя.

Результаты

[0302] Отсутствие пролиферации PBMC CLL на периферии создает проблему для лекарственных средств, для активности которых необходима активная пролиферация (Hu et al., Blood Adv.5(2021) 3152-3162). Отсутствие пролиферации образцов от пациентов с CLL из периферической крови подтверждали с использованием включения EdU (фигура 18A). В отличие от активно делящейся линии клеток JeKo-1, образец от пациента с CLL не делился. Эти образцы экспрессировали низкие уровни ROR1 (8000 рецепторов на клетки, фигура 18B). Наблюдали насыщение рецептора ROR1 на этих клетках (фигура 18C). После сокультивирования со здоровыми аллогенными пан-Т-клетками и образцами от пациентов с CLL наблюдали специфический лизис (фигура 18D) и сопутствующую активацию CD8 и CD4 (фигура 18E). Высвобождение цитокинов являлось умеренным для некоторых цитокинов (ИФН γ и ФНО α), и его не наблюдали для других, подобных ИЛ-6 (фигура 18F). Эти данные свидетельствуют о том, что PRO2668 может связывать и специфически лизировать неделящиеся образцы от пациентов с CLL, что приводит к активации Т-клеток и умеренным уровням высвобождения цитокинов.

Пример 15: Эффективность PRO2668 и PRO2670 *in vivo*

Способы

[0303] Замороженные PBMC размораживали на водяной бане при 37°C, центрифугировали, ресуспендировали в PBS и хранили на льду для инокуляции. Опухолевые клетки JeKo-1 поддерживали *in vitro* в среде RPMI1640, дополненной 20% эмбриональной телячьей сыворотки, при 37°C в атмосфере 5% CO $_2$. Клетки собирали во время экспоненциальной фазы роста и подсчитывали с использованием цитометра перед инокуляцией опухоли.

[0304] Каждая исследуемая группа состояла из пяти животных. Каждую мышь инокулировали подкожно в верхнюю область правого бока с использованием 5 \times 10 6 опухолевых клеток JeKo-1 в 0,1 мл PBS, смешанного с матригелем (1:1), для развития опухоли. 1 \times 10 7 PBMC имплантировали интраперитонеально через 3 дня после инокуляции опухоли. Рандомизацию осуществляли, когда средний размер опухоли достигал 80-100 мм 3 .

[0305] Введение доз начинали после рандомизации (день 0) и проводили каждые 5 дней впоследствии. После инокуляции опухоли животных ежедневно проверяли на заболеваемость и смертность. Во время рутинного мониторинга животных проверяли на любые эффекты роста опухоли и лечения в отношении поведения, такие как подвижность, потребление пищи и воды, увеличение/потеря массы тела (массу тела измеряли дважды в неделю после рандомизации), тусклость глаз/волос и любые другие отклонения. Смертность и наблюдаемые клинические признаки подробно регистрировали для отдельных животных.

[0306] Объемы опухолей измеряли дважды в неделю после рандомизации в двух измерениях с помощью калипера и выражали объем в мм 3 по формуле: $V=(L\times W\times W)/2$, где V является объемом опухоли, L является длиной опухоли (самое длинное измерение опухоли), и W является шириной опухоли (наибольшее измерение опухоли,

перпендикулярное L). Животных умерщвляли, если они теряли более 20% массы тела относительно массы в первый день лечения; если отдельная мышь с объемом опухоли $\geq 3000 \text{ мм}^3$ (отдельную мышь умерщвляли); или средний объем опухоли в группе $\geq 2000 \text{ мм}^3$ (всех мышей в одной группе умерщвляли).

Результаты

[0307] PRO2668 тестировали в исследовании эффективности *in vivo* с использованием модели ксенотрансплантата Jeko-1 человека. Клетки Jeko-1 имплантировали подкожно и вводили РВМС человека через 3 дня после приживления опухоли. Как можно видеть на фигуре 19, введение 1 мг/кг и 0,2 мг/кг PRO2668 приводило к значимому ингибированию роста опухоли по сравнению с неродственным белковым контролем паливизумабом. Не наблюдали различий эффективности относительно контроля в случае 0,04 мг/кг PRO2668. Наблюдали противоопухолевую эффективность PRO2670 в дозе 1 мг/кг, в то время как более низкие дозы не демонстрировали значимых различий объемов опухолей относительно контролей. Хотя обе молекулы казались эффективными, PRO2668 также демонстрирует эффективность в более низкой дозе 0,2 мг/кг.

Пример 16: Биофизическая характеристика scMATCH3 и вариантов MATCH4 PRO2667, PRO2668, PRO2669 и PRO2670

Стабильность при хранении и температура плавления

[0308] Молекулы MATCH4 подвергали 28-дневному исследованию стабильности, в котором молекулы составляли в водном буфере (50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 300 мМ сахарозы при pH 6,5) в количестве 1 мг/мл и хранили при $< -80^\circ\text{C}$, 4°C и 40°C в течение 14 дней. Фракцию мономеров и олигомеров в составе оценивали посредством интегрирования площадей пиков SE-ВЭЖХ в разные временные точки в течение исследования. В таблице 43 приведены содержание мономера в % и % потери мономера относительно дня 0. Изменения концентрации белка подвергали мониторингу посредством измерения в видимой и ультрафиолетовой областях света при 280 нм в течение исследования, и они приведены в таблице 44. Термическую стабильность анализировали посредством nDSF (NanoTemper), определяя точку начала разворачивания (T_{onset}) и среднюю точку разворачивания (T_m). Результаты в отношении T_m приведены в таблице 43.

[0309] Все четыре молекулы MATCH4 демонстрировали исключительные профили стабильности и не демонстрировали значимой потери содержания мономера или потери содержания белка через 28 дней инкубации. Не отмечали значимого изменения содержания мономера при температурах -80°C и 4°C , а также после повторяющихся циклов замораживания-размораживания (5 раз), что осуществляли с образцом дня 28/ -80°C перед измерением SE-ВЭЖХ/УФ, и лишь минорную потерю содержания мономера после хранения в течение 28 дней при 40°C .

Таблица 43: Оценка стабильности MATCH4 при концентрации 1 мг/мл, изменение содержания мономера с течением времени.

ID белка	Тем пер	Кон цен	Содержание мономера [%]	% потери содержания мономера	nDSF (Nan

PRO26 67	-80	1,07	1,07	NA	NA	NA	1,04 *	NA	NA	NA	3,0*
	4		1,07	1,03	1,06	1,04	1,08	3,9	0,5	2,6	-1,2
	40		1,07	1,16	1,01	1,06	1,08	-8,1	5,2	0,9	-1,3
PRO26 68	-80	1,01	1,01	NA	NA	NA	1,11 *	NA	NA	NA	-10,3*
	4		1,01	1,20	1,13	1,06	1,14	-19,1	-11,9	-5,1	-12,7
	40		1,01	1,09	1,02	0,99	0,99	-8,1	-0,7	2,5	1,5
PRO26 69	-80	1,06	1,06	NA	NA	NA	1,03 *	NA	NA	NA	3,0*
	4		1,06	1,10	1,02	1,03	1,13	-3,6	3,6	2,2	-7,2
	40		1,06	1,06	0,99	1,04	1,04	-0,2	6,1	2,0	1,5
PRO26 70	-80	1,06	1,06	NA	NA	NA	1,16 *	NA	NA	NA	0,2*
	4		1,06	1,18	1,08	1,08	1,15	-11,4	-1,5	-1,7	-8,7
	40		1,06	1,16	1,04	0,99	1,04	-9,0	1,7	6,6	2,0
*перед измерением образец подвергали 5 повторяющимся циклам замораживания/размораживания											
NA: не измерено											

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) один или два связывающих домена, специфически связывающихся с внеклеточным доменом ROR1 (ROR1-BD); и

б) один связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD3-BD);

где

- мультиспецифическое антитело не содержит Fc-область иммуноглобулина;

- указанные ROR1-BD содержат независимо друг от друга набор последовательностей CDR, выбранных из набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 1,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 3,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 4,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 5 и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 6;

и/или набора, состоящего из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 13 или 14,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 15,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 16,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 17,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 18 и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 19;

- указанный CD3-BD содержит набор последовательностей CDR, состоящий из

последовательности HCDR1 SEQ ID NO: 30,

последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 31,

последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 32,

последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 33,

последовательности LCDR2 SEQ ID NO: 34 и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 35.

2. Мультиспецифическое антитело по п.1, где, если указанное мультиспецифическое антитело содержит два ROR1-BD, указанные два ROR1-BD содержат одинаковые наборы CDR, то есть оба ROR1-BD содержат CDR SEQ ID NO: 1-6 или CDR SEQ ID NO: 13/14-19.

3. Мультиспецифическое антитело по п.1 или 2, где указанное антитело дополнительно содержит один связывающий домен, специфически связывающийся с сывороточным альбумином человека (hSA-BD).

4. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело имеет один или более из следующих признаков 1)-5):

1) указанное мультиспецифическое антитело не содержит области CH1 и/или CL;

2) указанный один или два ROR1-BD, указанный CDR-BD и указанный hSA-BD, при наличии, содержат каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH1a, VH1b, VH3 или

VH4; в частности, каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3 или VH4; в частности, каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3; или

указанные один или два ROR1-BD, указанный CDR-BD и указанный hSA-BD, при наличии, содержат домен VH, содержащий каркасные области FR1, FR2, FR3 и FR4 VH, выбранные из подтипа каркаса VH, в частности, из подтипов каркаса VH VH1a, VH1b, VH3 и VH4, в частности, из подтипов каркаса VH VH3 и VH4, в частности, принадлежат подтипу VH3; где указанные каркасные области FR1, FR2, FR3 и FR4 VH имеют следующие замены (нумерация АНо): аргинин (R) в положении аминокислоты 12; треонин (T) в положении аминокислоты 103 и глутамин (Q) в положении аминокислоты 144;

3) указанные один или два ROR1-BD, указанный CDR-BD и указанный hSA-BD, при наличии, содержат домен VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3 VL, выбранные из подтипов Vk, в частности, подтипов Vk1 и Vk3, в частности, принадлежат подтипу Vk1, и каркас FR4 VL, являющийся FR4 Vλ, в частности, является FR4 Vλ, содержащим аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности в отношении любых из SEQ ID NO: 76-83, более конкретно - FR4 Vλ, выбранной из любых из SEQ ID NO: 76-83, в частности, FR4 Vλ в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 83;

4) указанное мультиспецифическое антитело является гуманизированным, в частности, указанное мультиспецифическое антитело является гуманизированным и содержит полученные из кролика CDR;

5) указанное мультиспецифическое антитело является триспецифическим, в частности, триспецифическим и тривалентным или триспецифическим и тетравалентным.

5. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где формат указанного мультиспецифического антитела выбран из scDb-scFv, scMATCH3, MATCH3 и MATCH4.

6. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат

а) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 7 и 10; и

б) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9 и 12;

или

а) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 20, 23, 26 и 28; и

б) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 22, 25, 27 и 29;

или

а) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 8 и 11; и

б) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 9 и 12;

или

а) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 21 и 24; и

б) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 22 и 25.

7. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанные один или два ROR1-BD содержат

а) последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

б) последовательность VH SEQ ID NO: 10 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

с) последовательность VH SEQ ID NO: 20 и последовательность VL SEQ ID NO: 22;

или

д) последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;

или

е) последовательность VH SEQ ID NO: 8 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

ф) последовательность VH SEQ ID NO: 11 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

г) последовательность VH SEQ ID NO: 21 и последовательность VL SEQ ID NO: 22;

или

г) последовательность VH SEQ ID NO: 24 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;

или

и) последовательность VH SEQ ID NO: 26 и последовательность VL SEQ ID NO: 27;

или

ж) последовательность VH SEQ ID NO: 28 и последовательность VL SEQ ID NO: 29;

в частности, где указанные один или два ROR1-BD содержат

а) последовательность VH SEQ ID NO: 7 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;

или

б) последовательность VH SEQ ID NO: 10 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;

или

- или
с) последовательность VH SEQ ID NO: 23 и последовательность VL SEQ ID NO: 25;
или
d) последовательность VH SEQ ID NO: 8 и последовательность VL SEQ ID NO: 9;
или
e) последовательность VH SEQ ID NO: 11 и последовательность VL SEQ ID NO: 12;
или
f) последовательность VH SEQ ID NO: 24 и последовательность VL SEQ ID NO: 25.

8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный CD3-BD содержит

a) последовательность VH, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 36 или 37; и

b) последовательность VL, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 38;

в частности,

a) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37, и

b) домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

9. Мультиспецифическое антитело по п.4, где указанный hSA-BD содержит

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(ii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(iii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или

(iv) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или

(v) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vi) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(viii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; или

в частности,

(v) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vi) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и

домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; или

(vii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70

(viii) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

10. ROR1-BD по любому из пп.1, 4, 6 и 7.

11. Нуклеиновая кислота или две нуклеиновые кислоты, кодирующие мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-9 или ROR1-BD по п.10.

12. Вектор или два вектора, содержащие нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по п.11.

13. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по п.12.

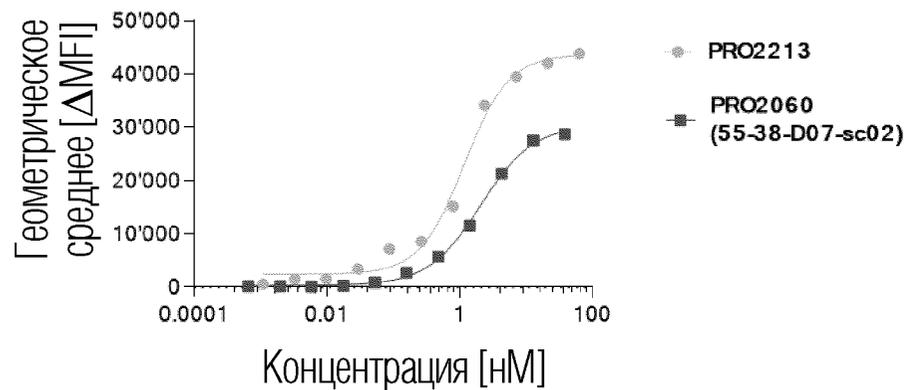
14. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-9 или фармацевтическая композиция по п.14 для применения в лечении ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования, в частности, ROR1-экспрессирующего злокачественного новообразования, выбранного из хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (CLL/SLL), острого миелолейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), волосатоклеточного лейкоза, фолликулярной лимфомы (FL), лимфомы из клеток маргинальной зоны (MZL), неходжкинской лимфомы (NHL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), синдрома Рихтера (RS), рака легких, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака толстого кишечника, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака яичника, глиобластомы, рака яичка, рака матки, рака надпочечников, меланомы, нейробластомы, саркомы и рака почки.

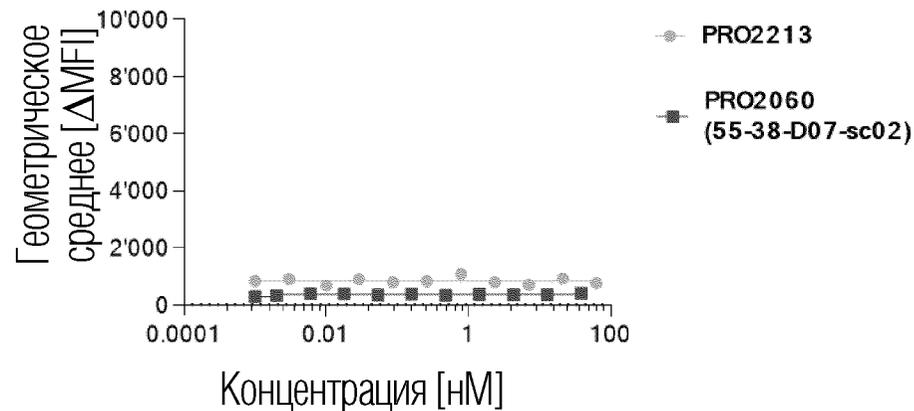
По доверенности

ФИГ. 1

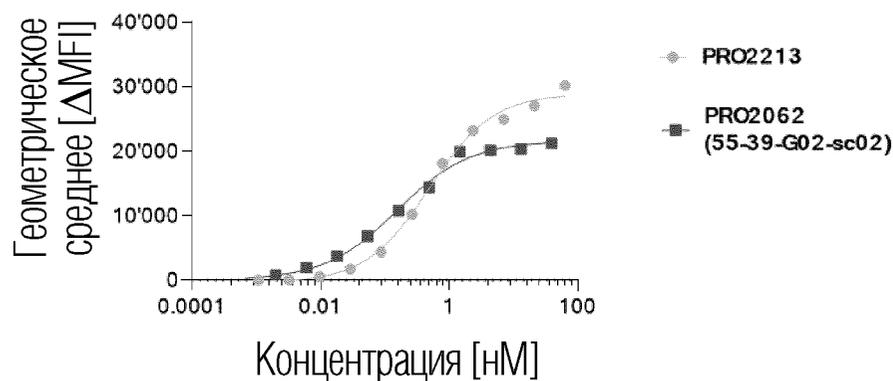
A Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



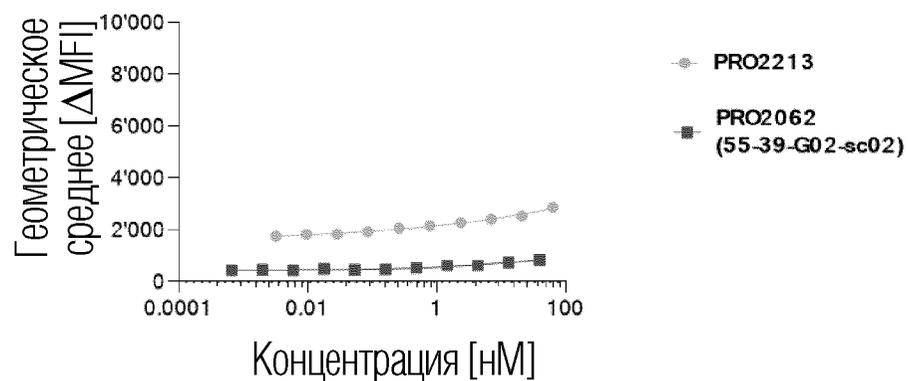
B Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии



C Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии

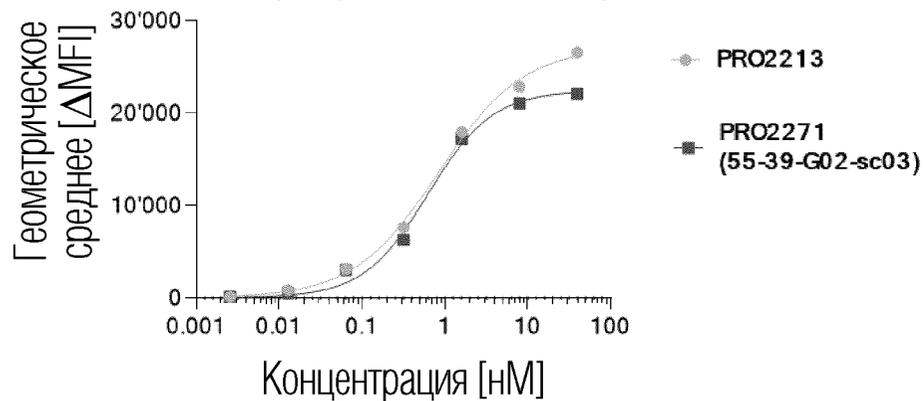


D Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии

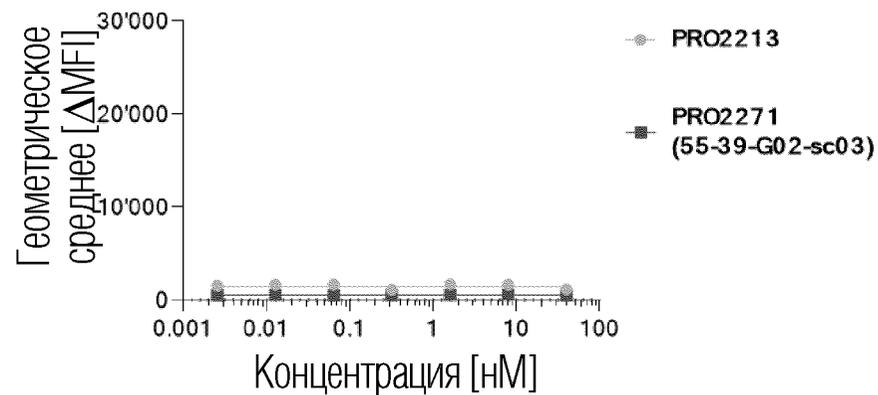


ФИГ. 2

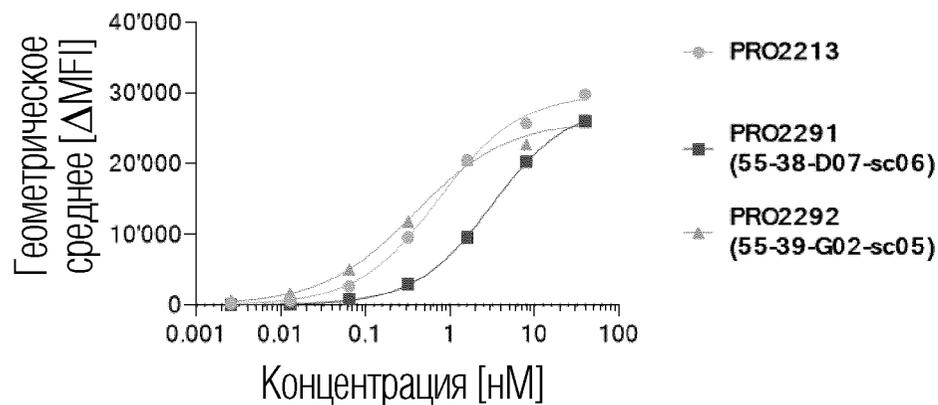
A Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



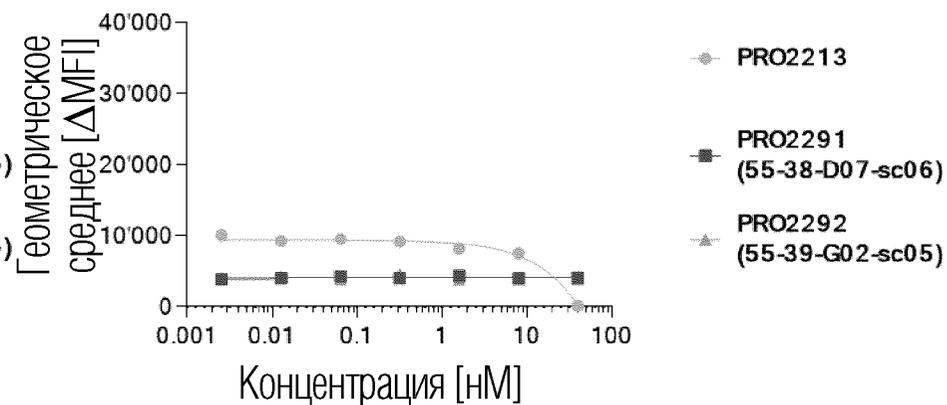
B Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии



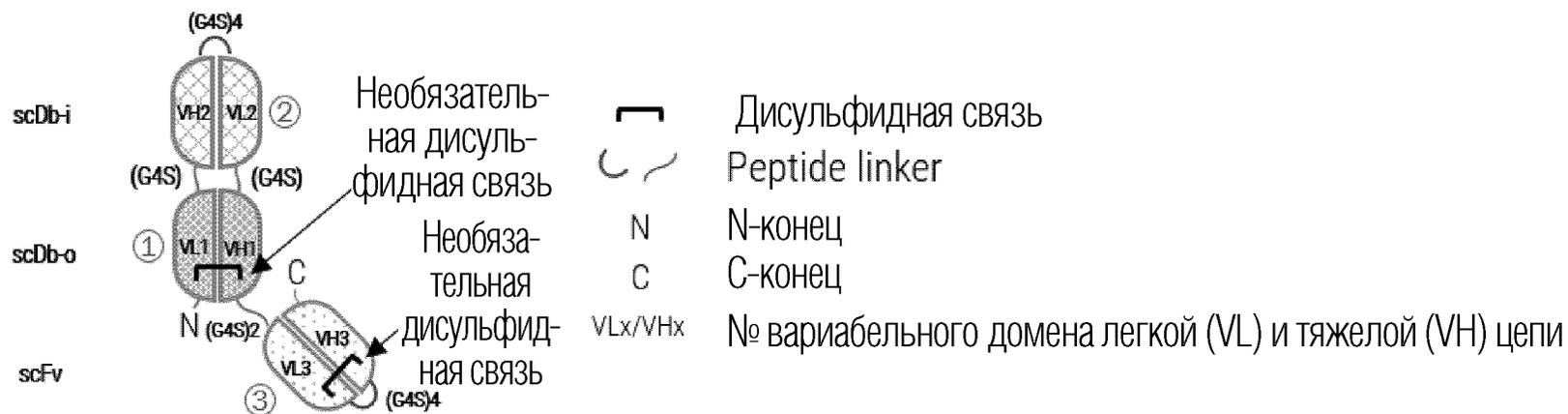
C Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



D Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии

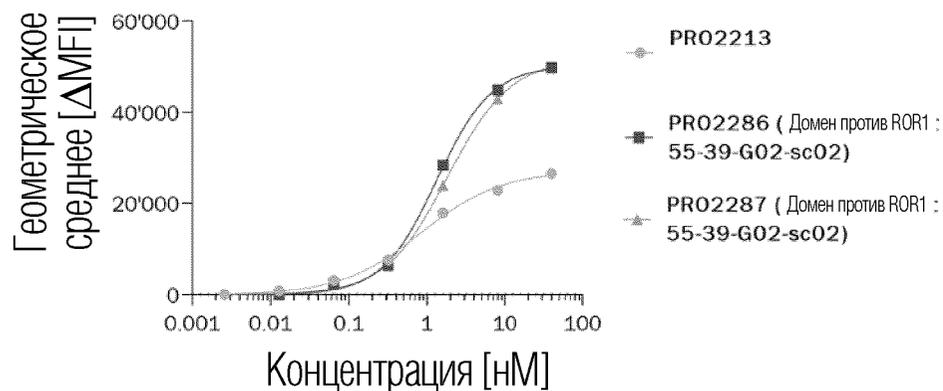


ФИГ. 3

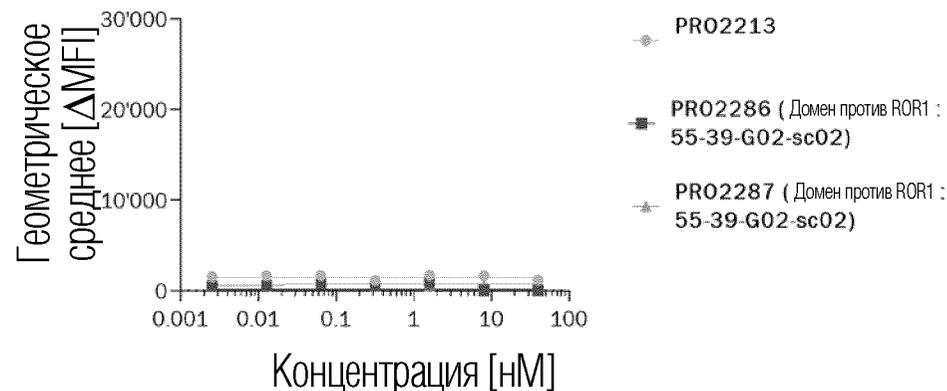


ФИГ. 4

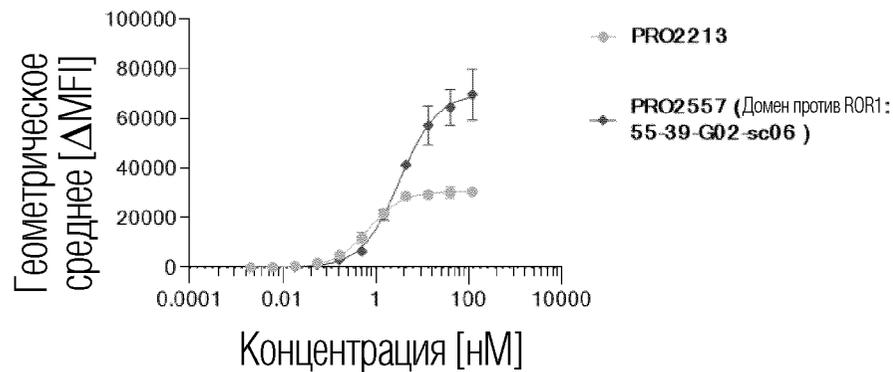
A Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



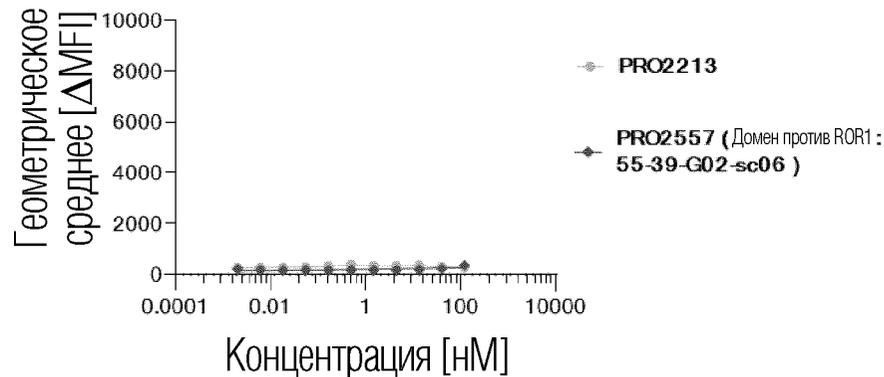
B Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии



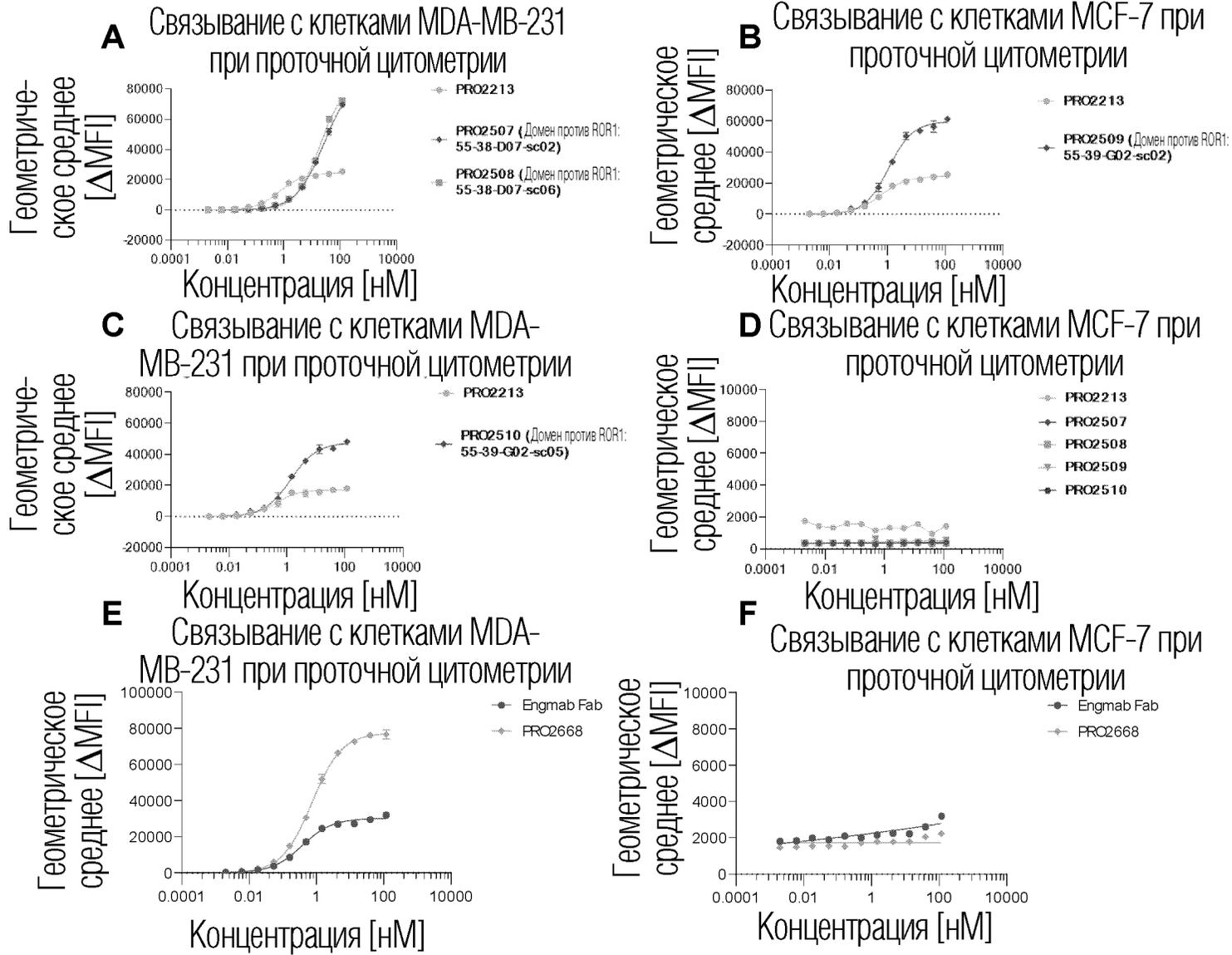
C Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



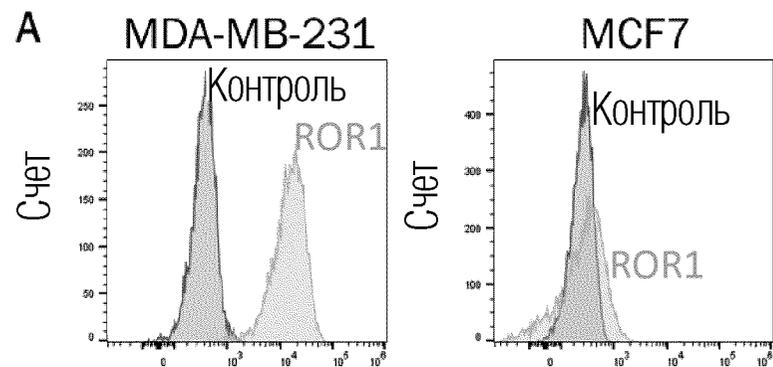
D Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии



ФИГ. 5



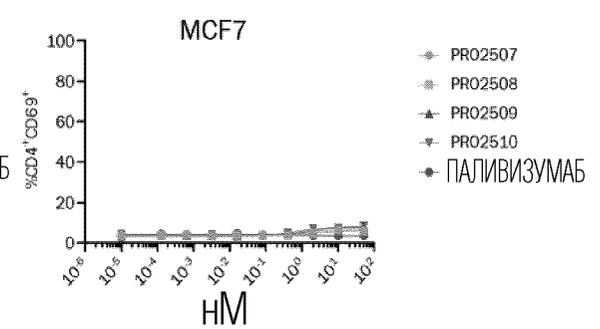
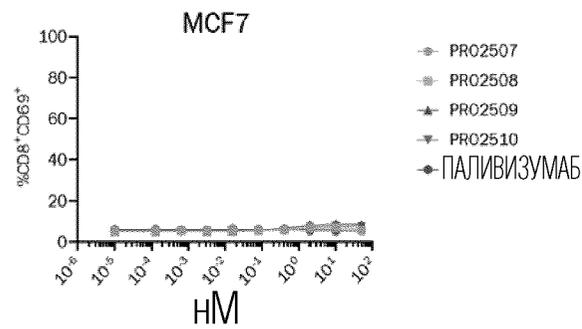
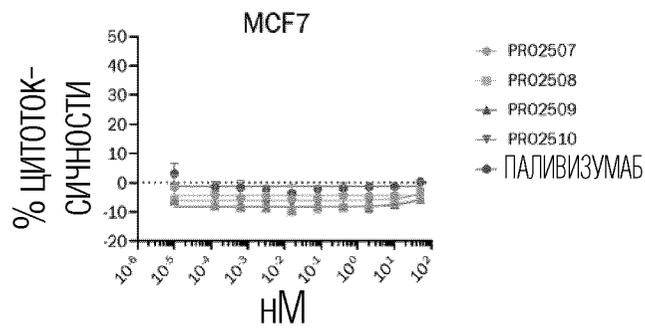
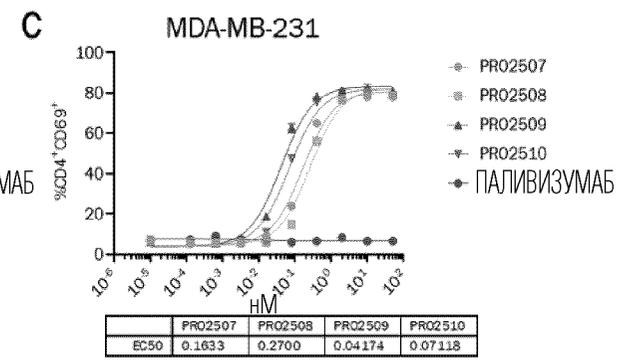
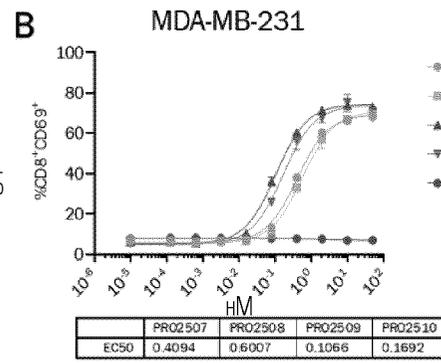
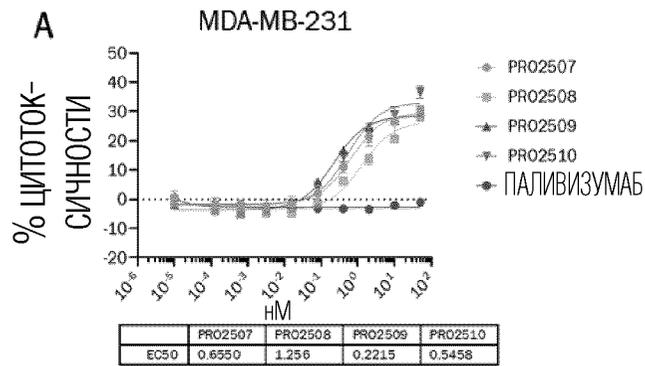
ФИГ. 6



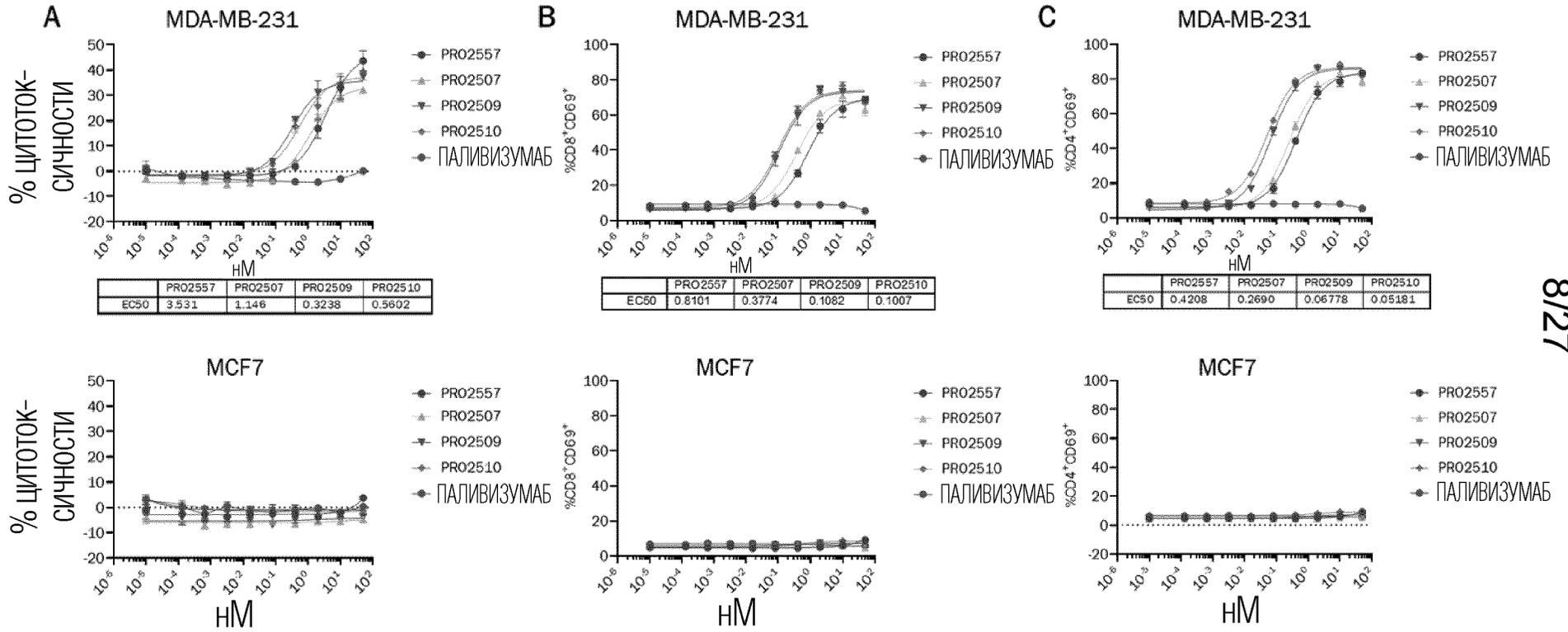
B

Линия клеток	Относительная способность антитела к связыванию
MDA-MB-231	59,745
MCF7	775

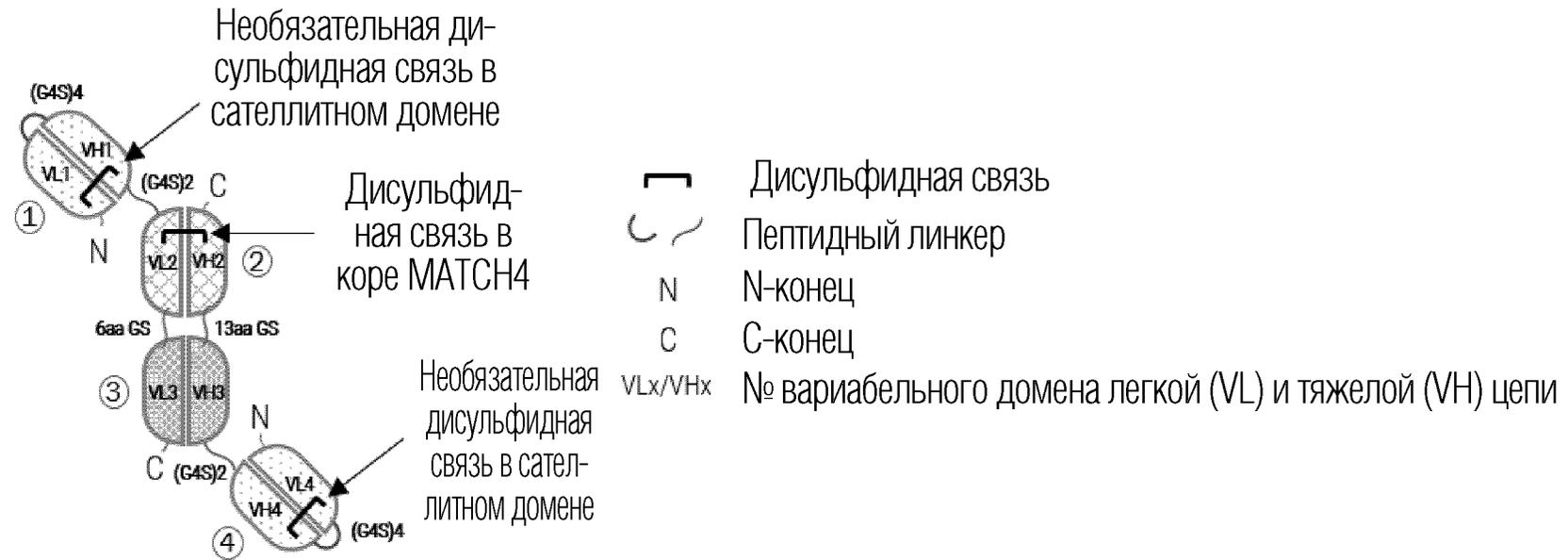
ФИГ. 7



ФИГ. 8

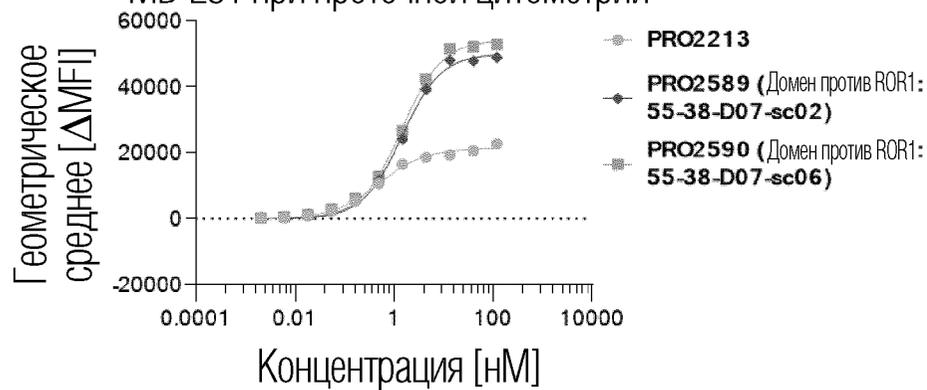


ФИГ. 9

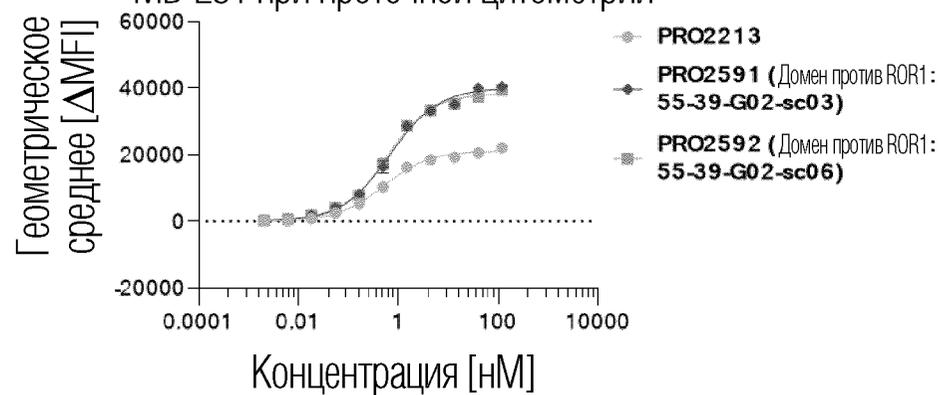


ФИГ. 10

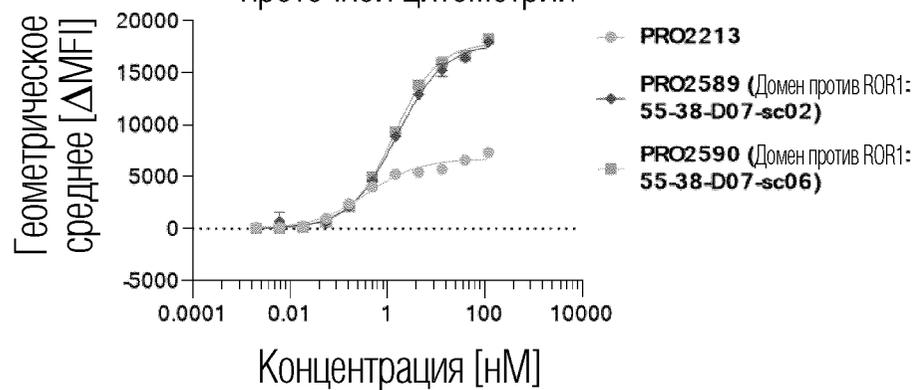
A Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



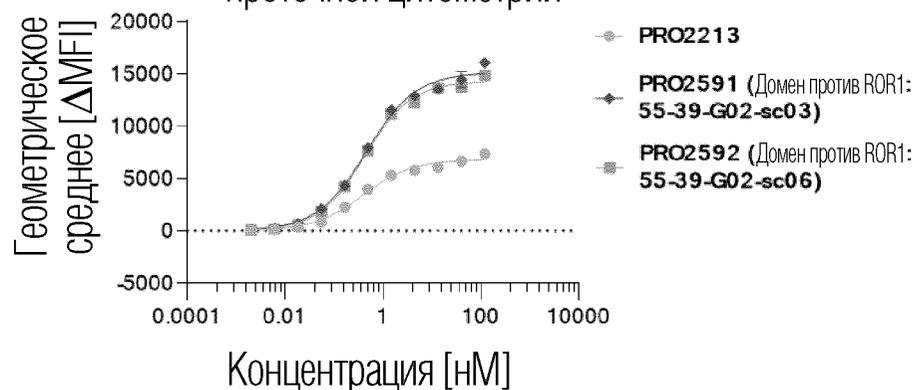
B Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



C Связывание с клетками JIMT-1 при проточной цитометрии

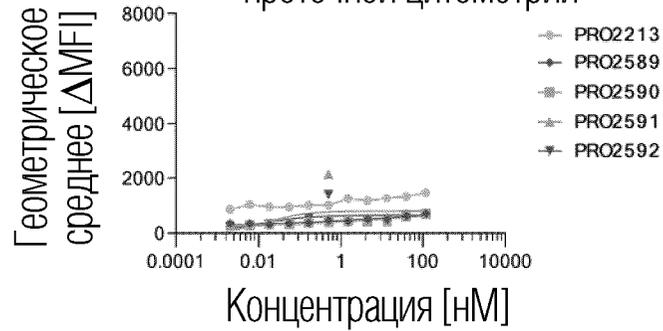


D Связывание с клетками JIMT-1 при проточной цитометрии

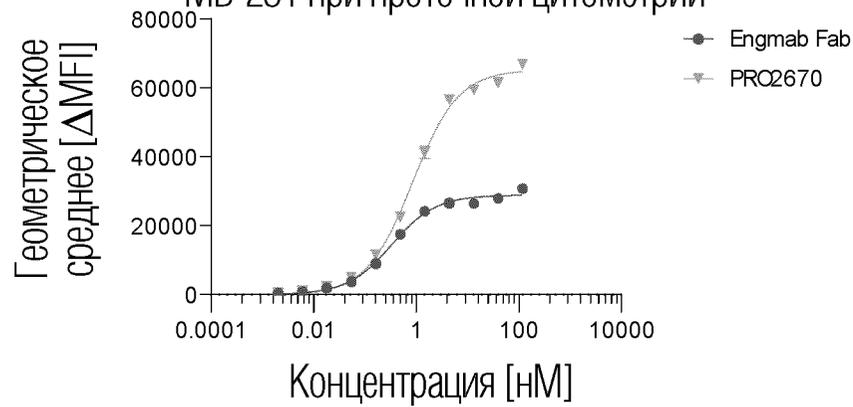


ФИГ. 10 (продолжение)

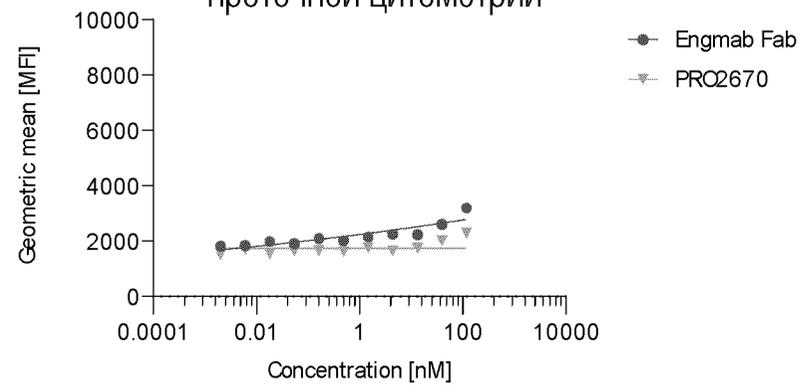
E Связывание с клетками MCF-7 при проточной цитометрии



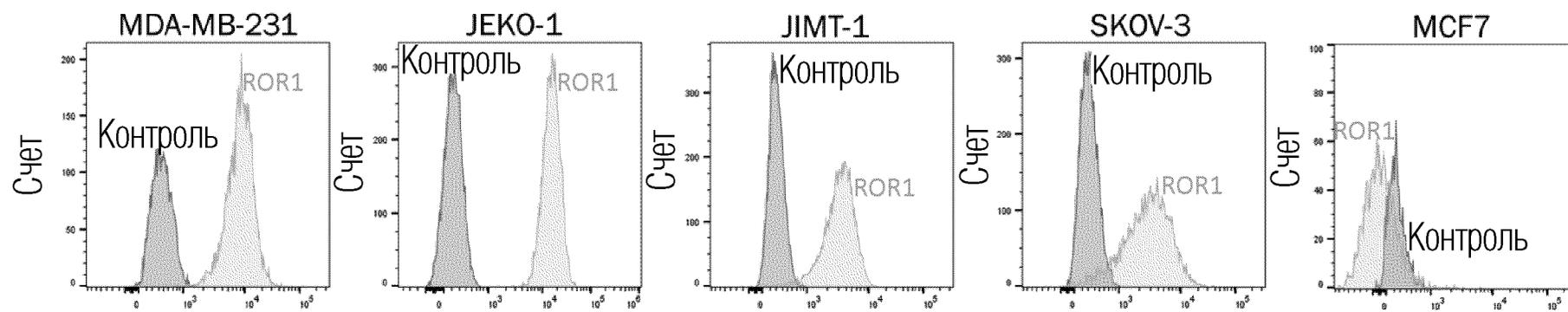
F Связывание с клетками MDA-MB-231 при проточной цитометрии



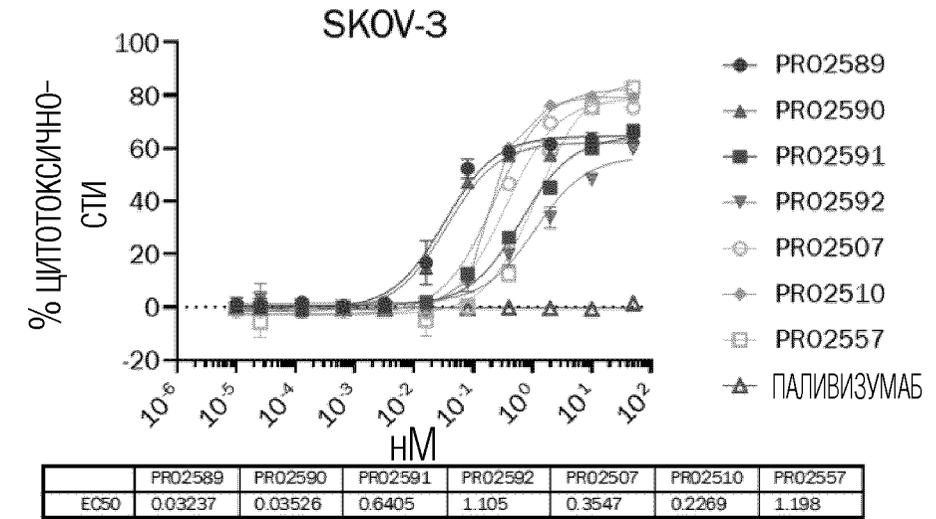
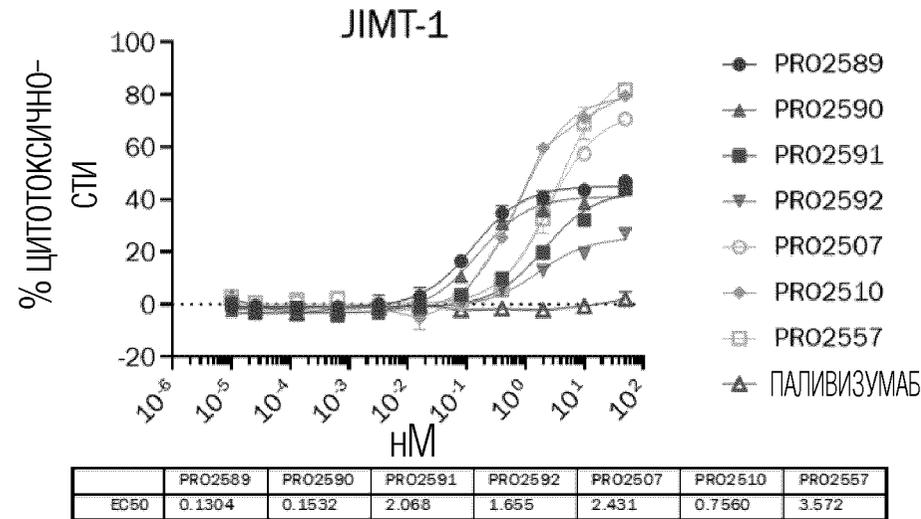
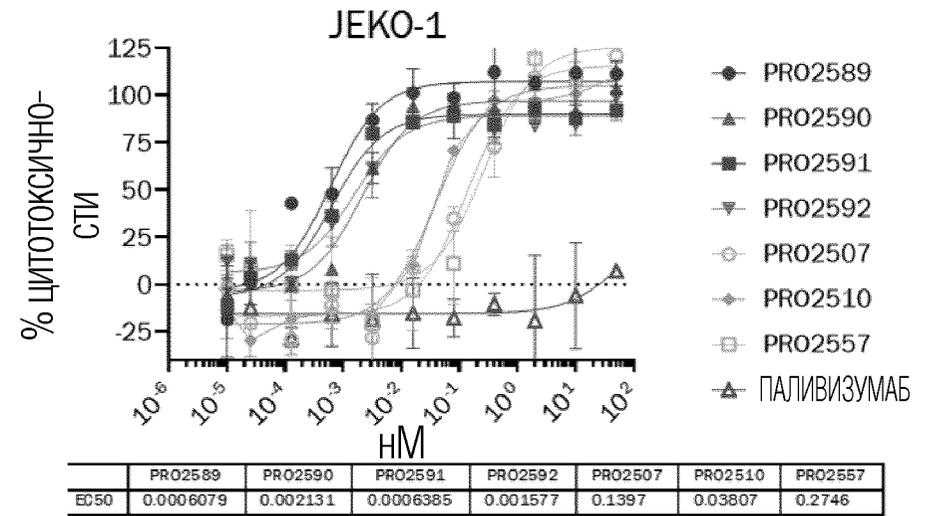
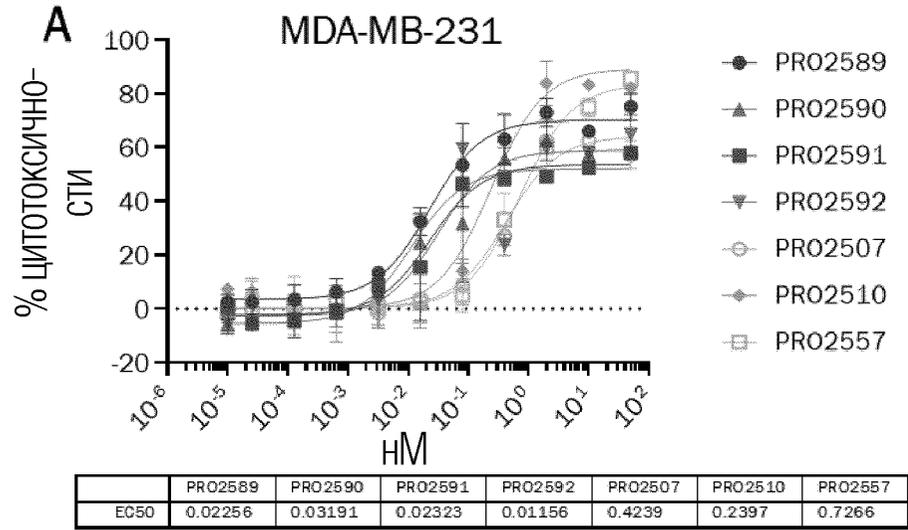
G Связывание с клетками JIMT-1 при проточной цитометрии



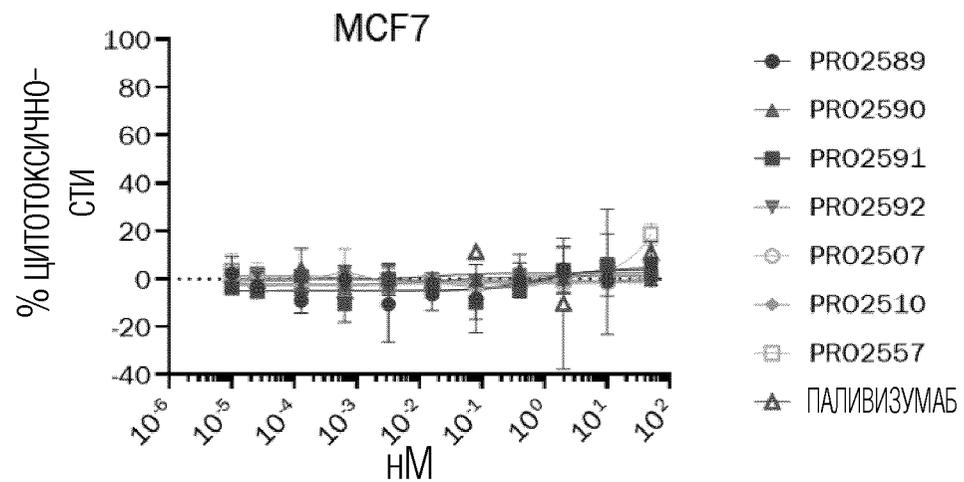
ФИГ. 11



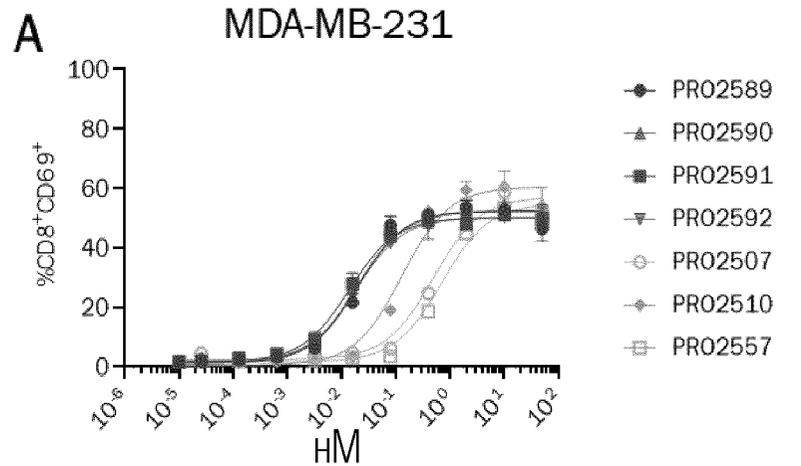
ФИГ. 12



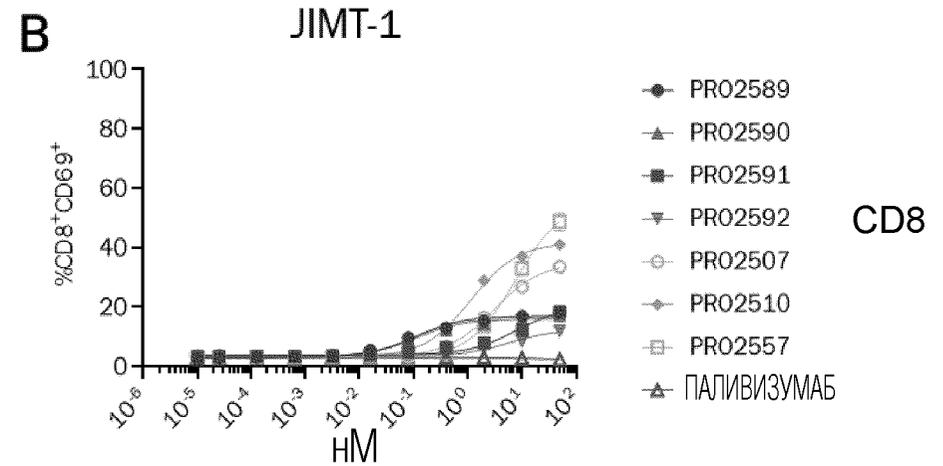
ФИГ. 12 (продолжение)



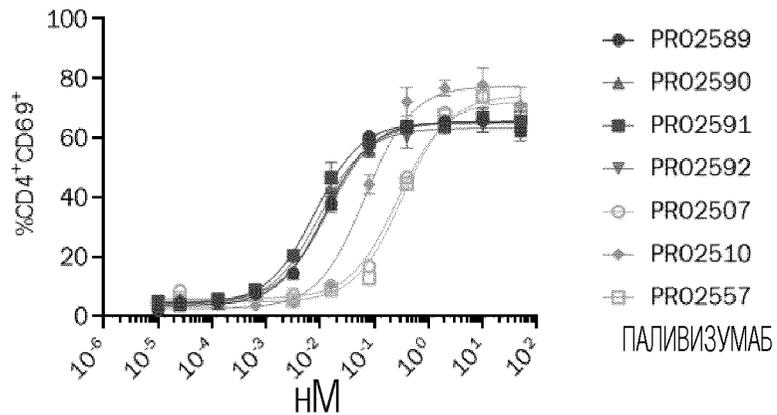
ФИГ. 13



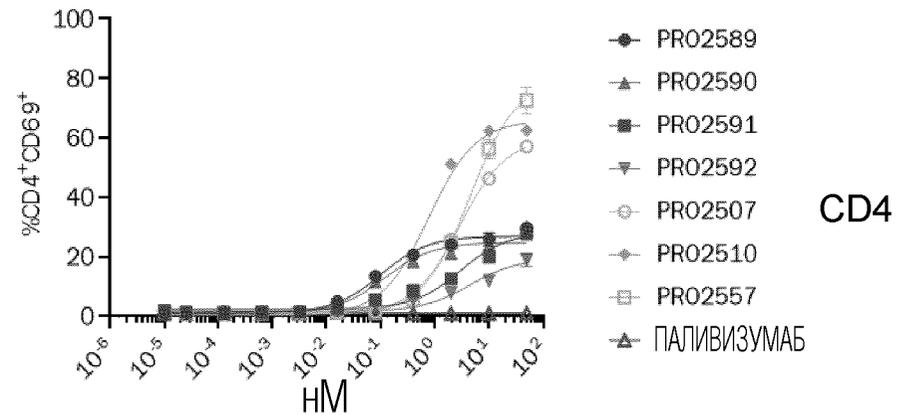
	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.01946	0.01942	0.01382	0.01846	0.4933	0.1303	0.7138



	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.1068	0.1127	7.716	5.508	3.103	1.149	7.816



	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.01230	0.01380	0.007973	0.009720	0.2699	0.06790	0.3281

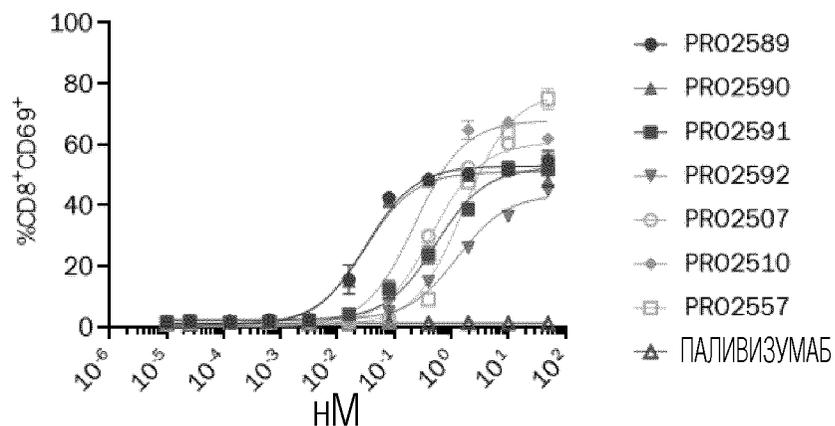


	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.1015	0.1215	2.950	4.434	2.919	0.7765	4.480

ФИГ. 13 (продолжение)

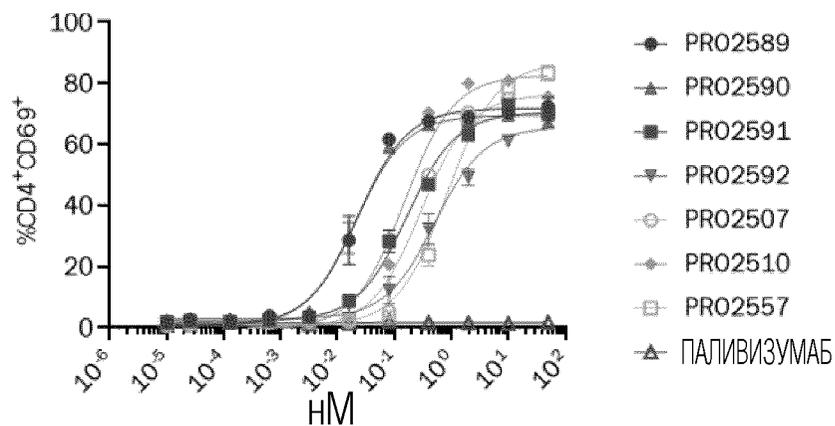
С

SKOV-3



CD8

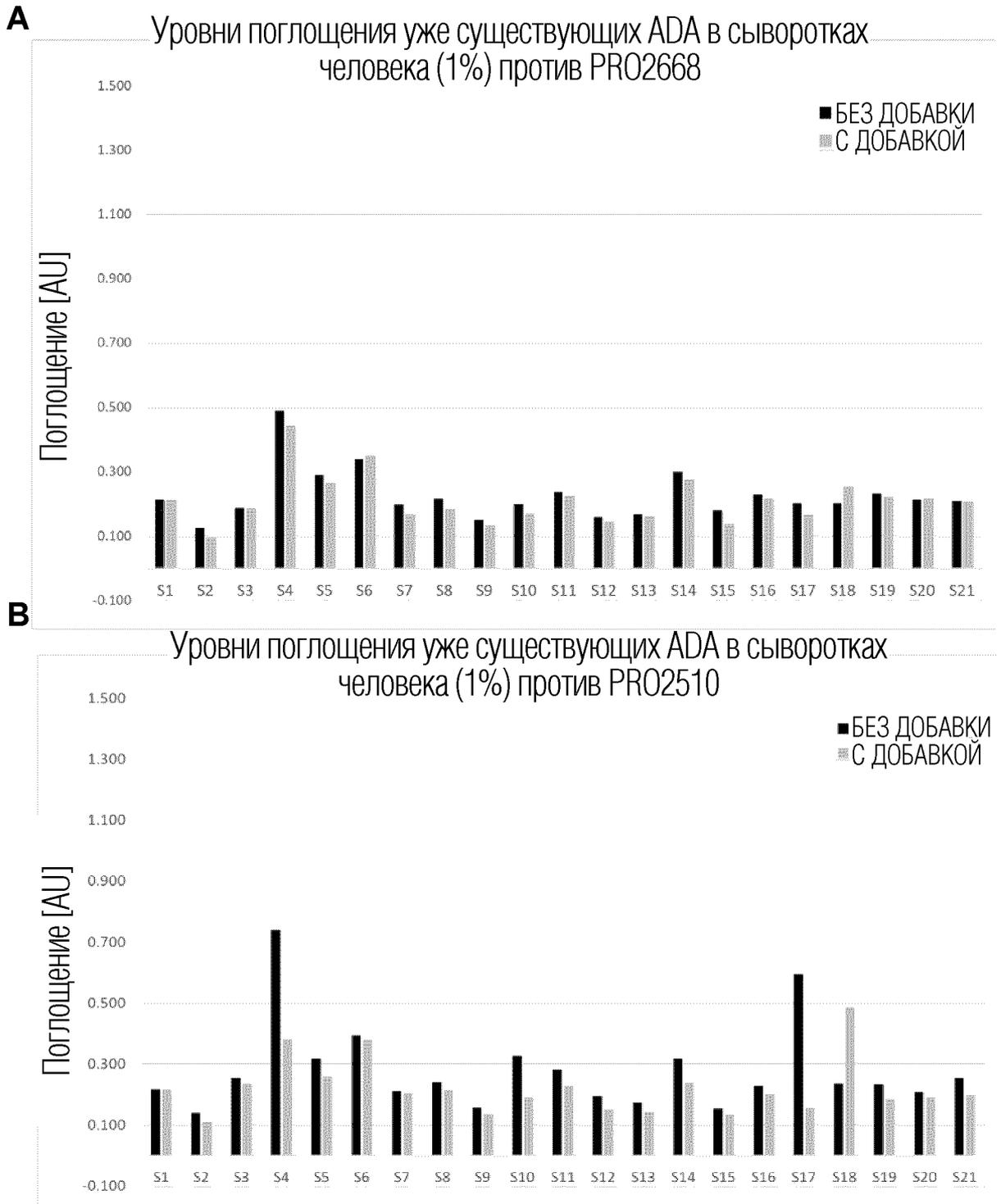
	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.03174	0.03089	0.5409	1.285	0.4590	0.2325	1.670



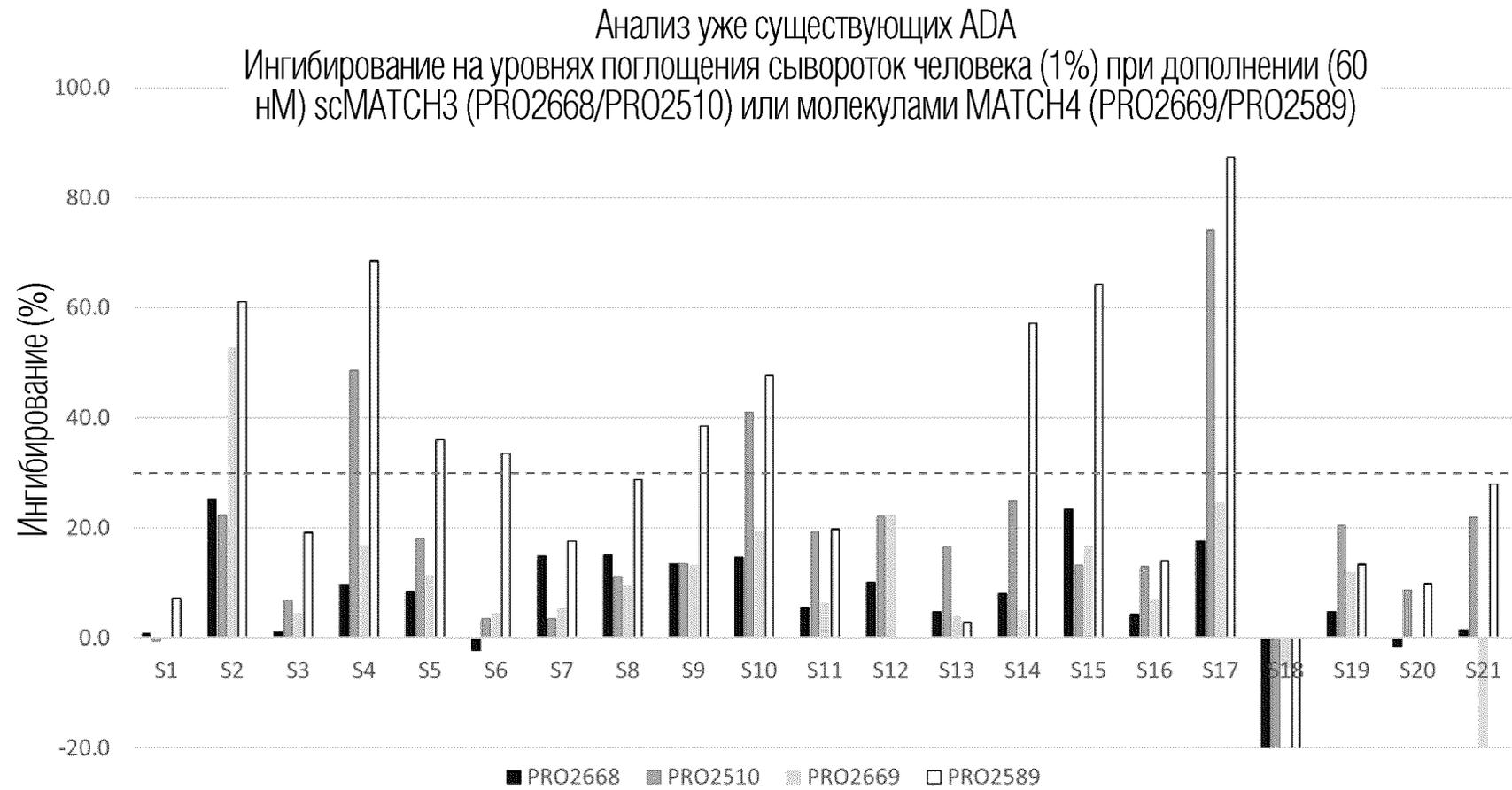
CD4

	PRO2589	PRO2590	PRO2591	PRO2592	PRO2507	PRO2510	PRO2557
EC50	0.02274	0.02133	0.1644	0.5075	0.2949	0.1501	0.8418

ФИГ. 14

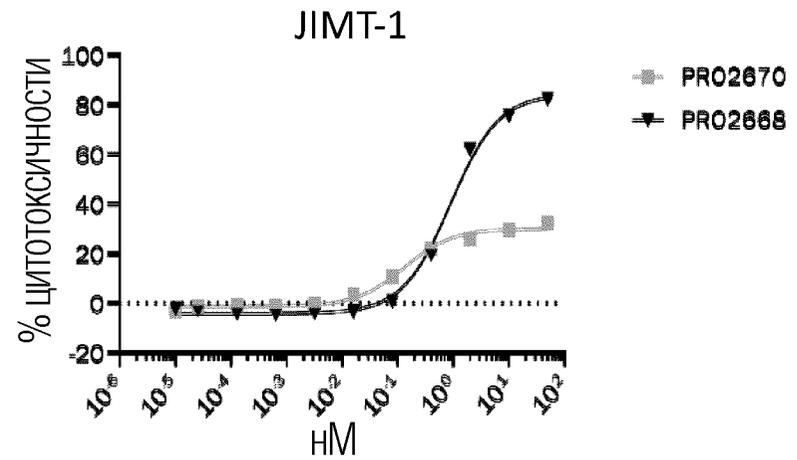
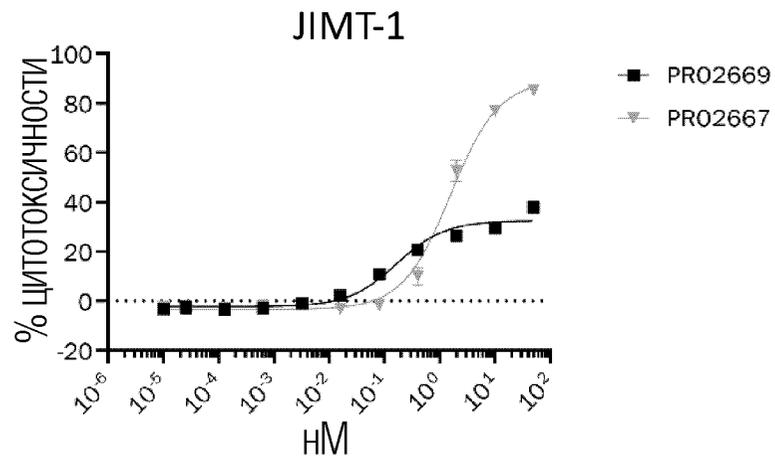
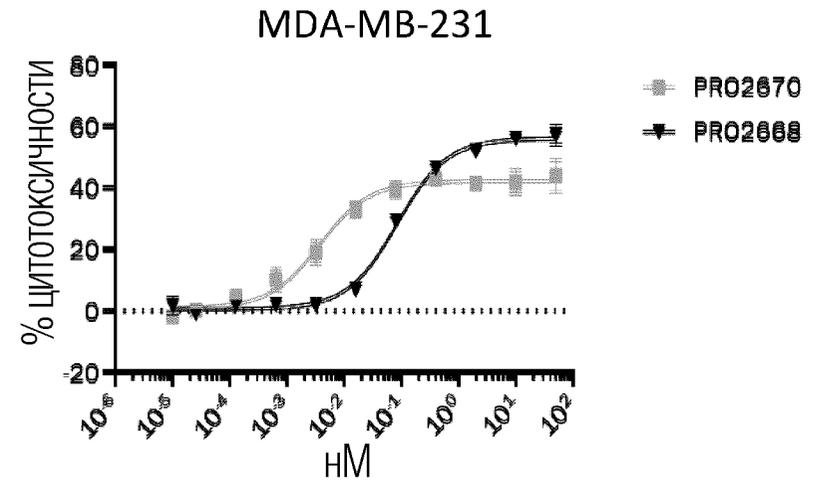
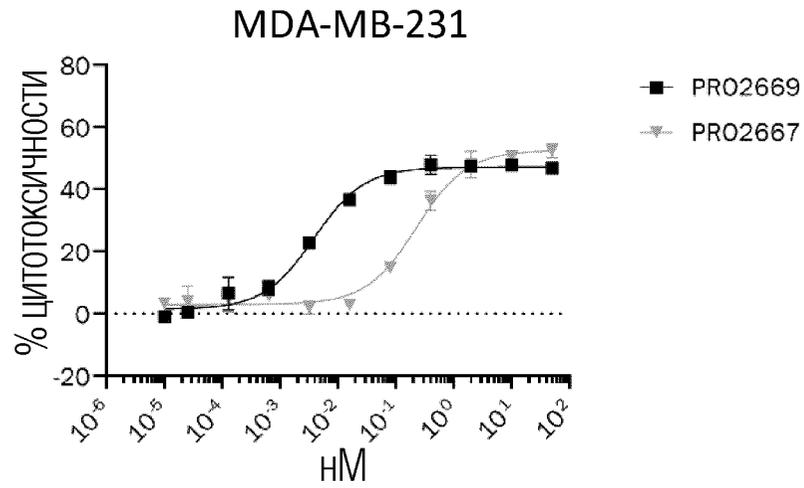




E

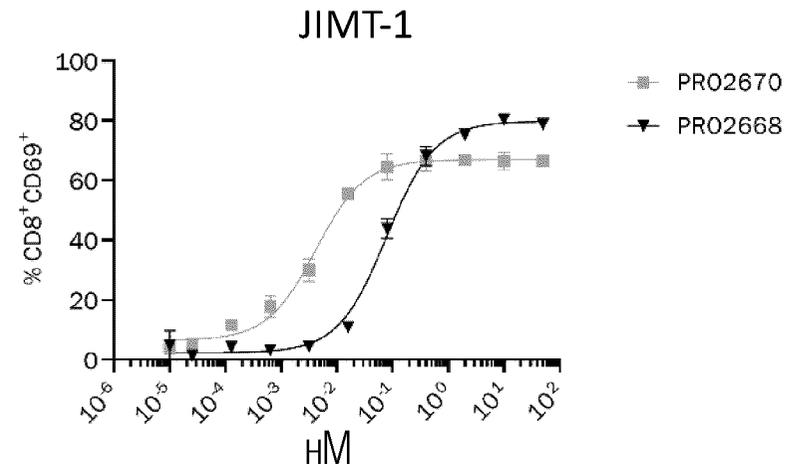
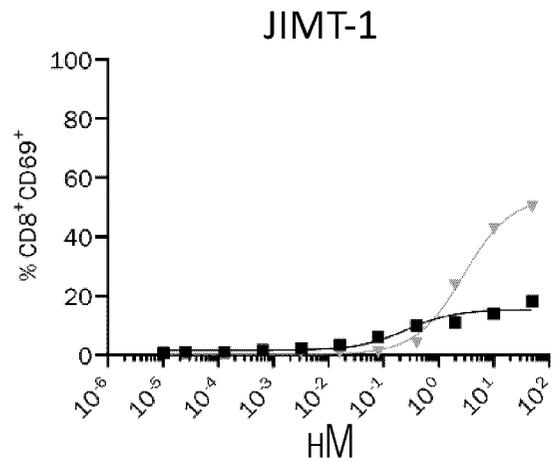
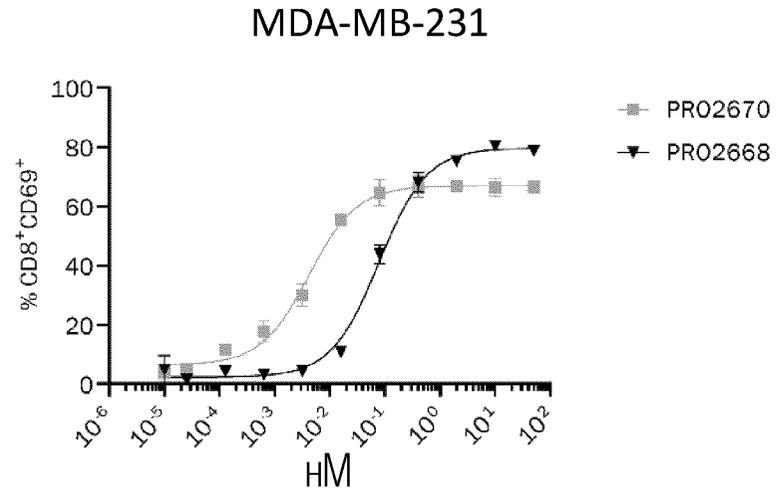
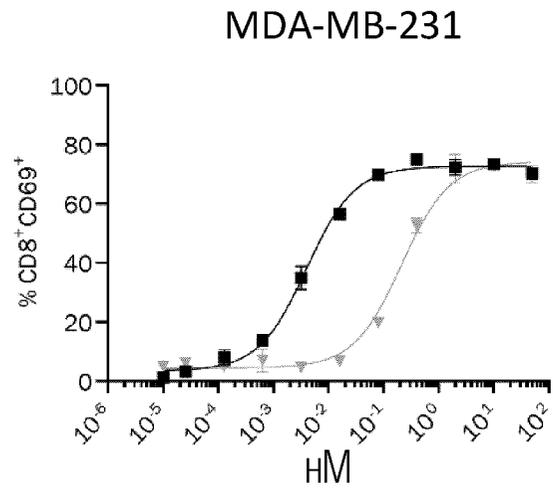
ФИГ. 15

A



ФИГ. 15 (продолжение)

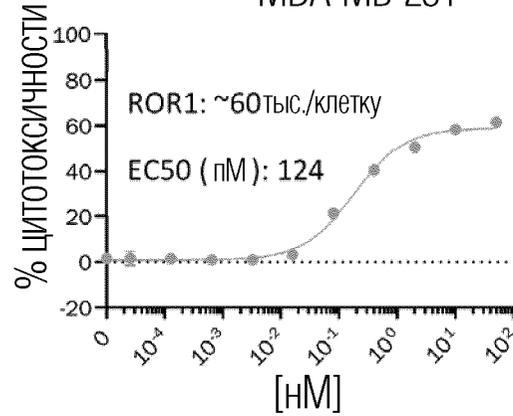
B



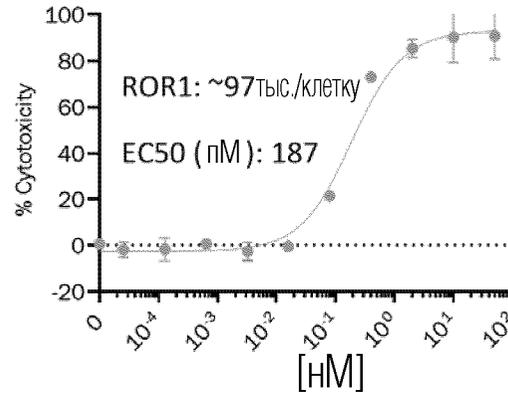
ФИГ. 16

A

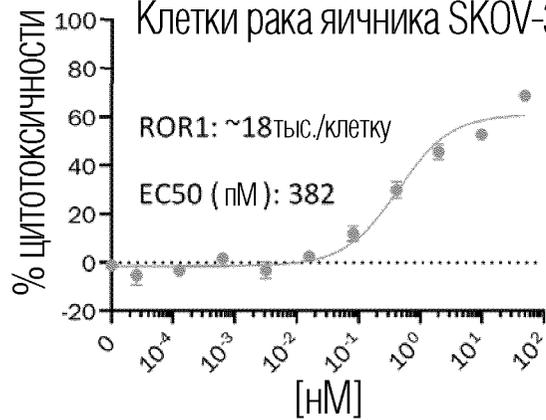
Клетки рака молочной железы
MDA-MB-231



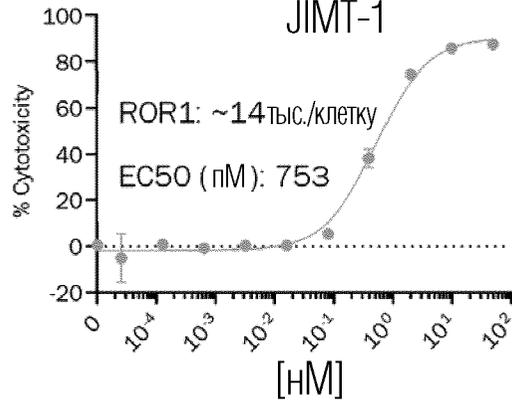
Клетки рака легких A549



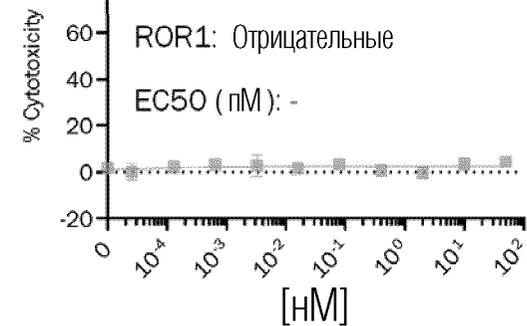
Клетки рака яичника SKOV-3



Клетки рака молочной железы
JMT-1



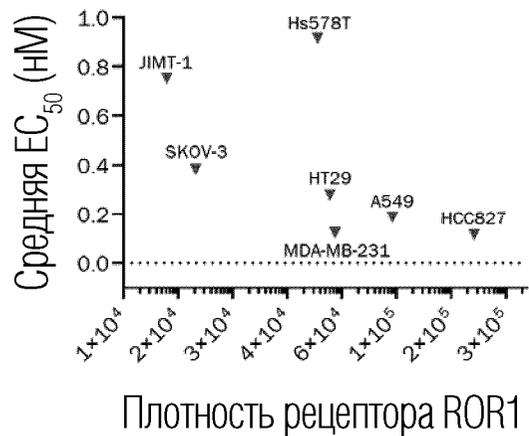
Клетки рака молочной железы
HCC1954



ФИГ. 16 (продолжение)

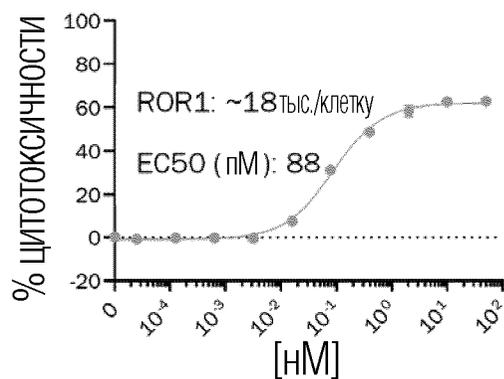
В

EC₅₀ цитотоксичности vs. ROR1

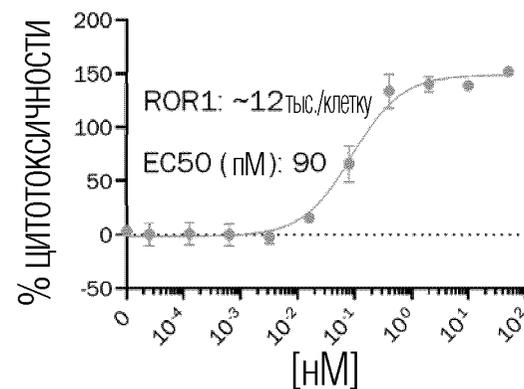


С

Клетки лимфомы из клеток мантийной зоны Mipo

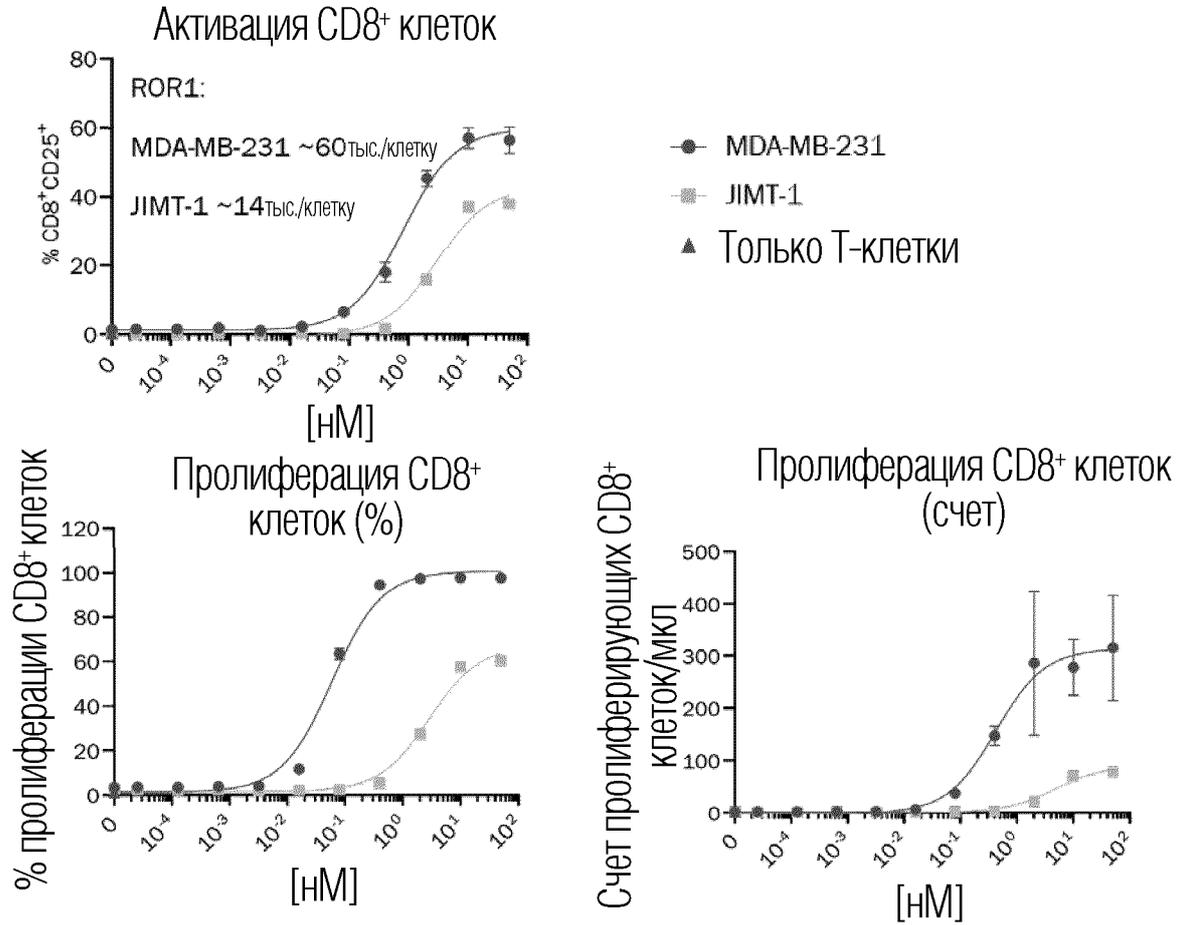


Клетки лимфомы из клеток мантийной зоны Z-138

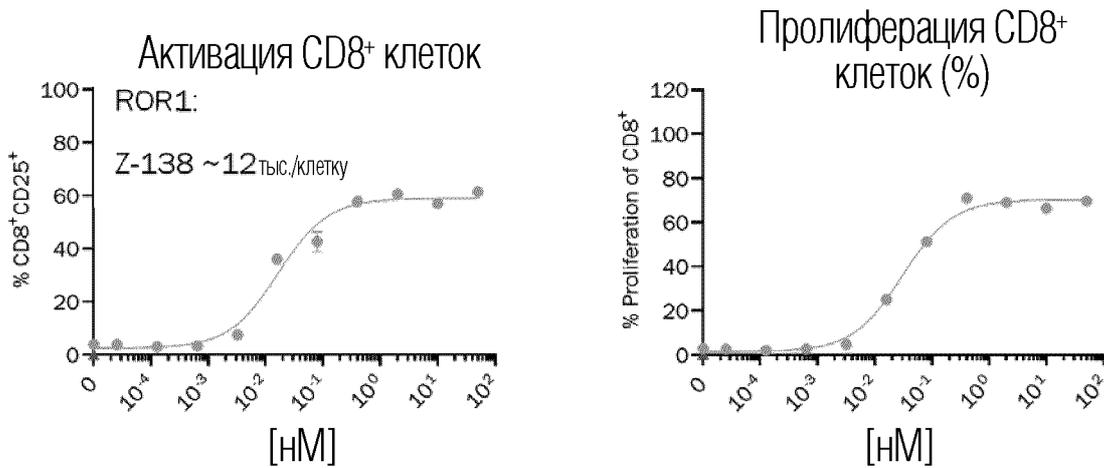


ФИГ. 17

А

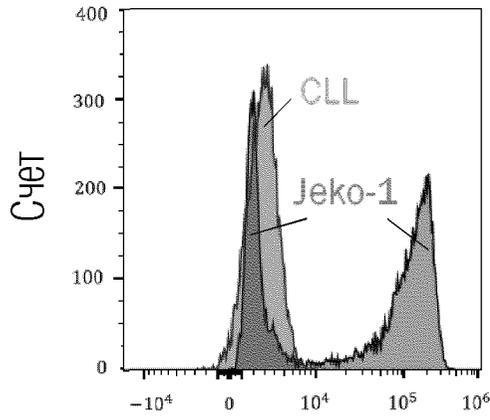


В

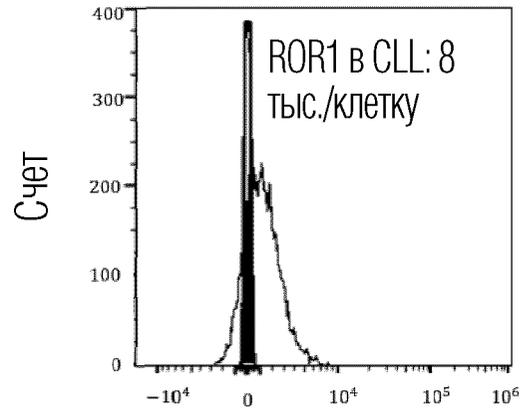


ФИГ. 18

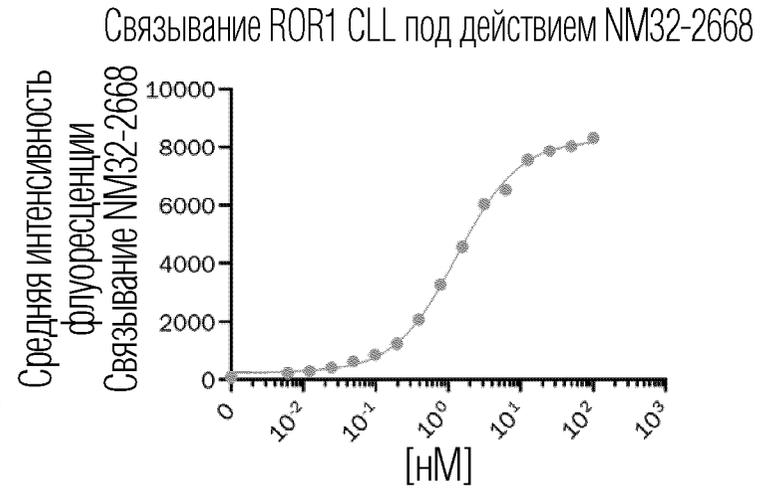
A



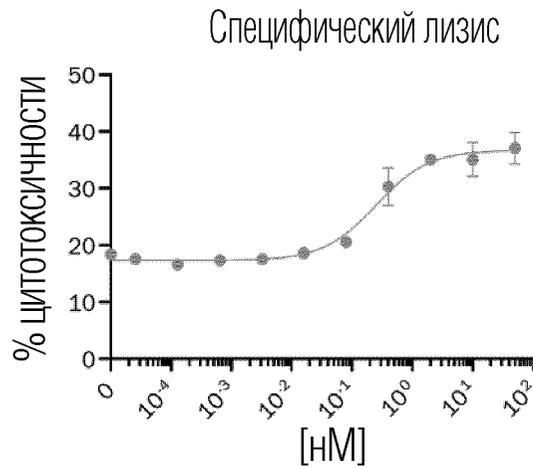
B



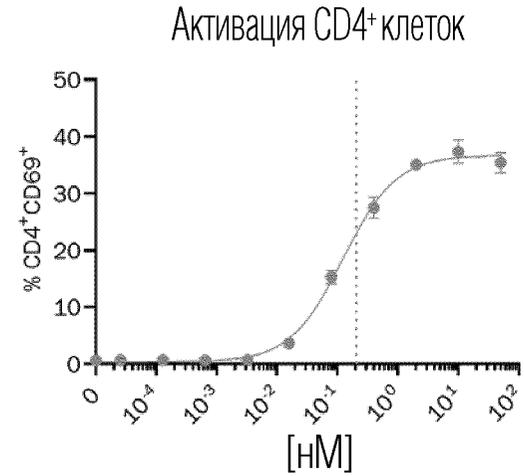
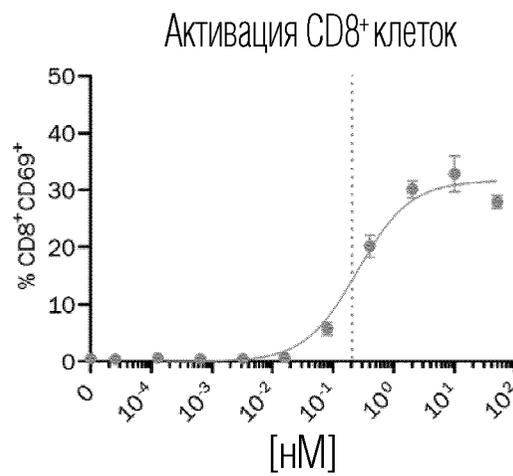
C



D

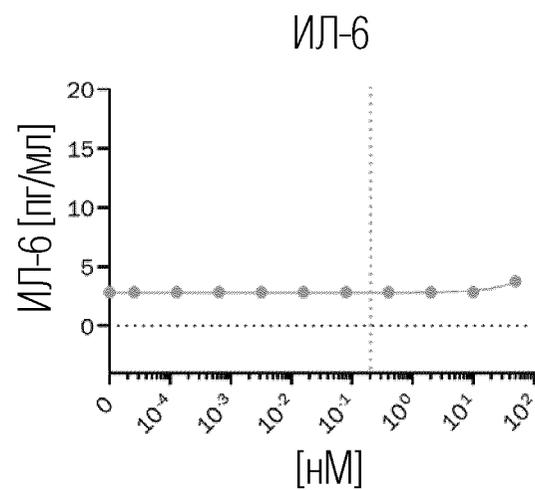
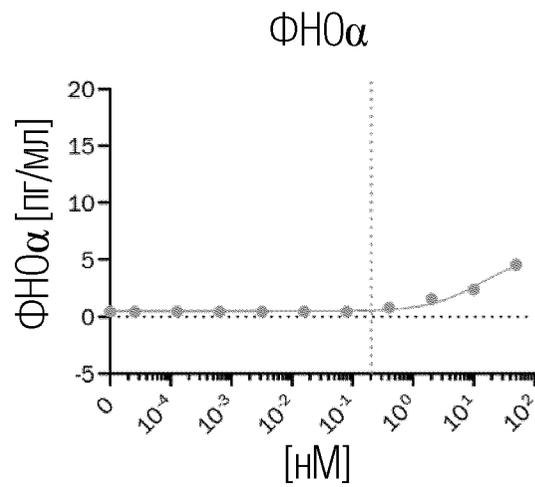
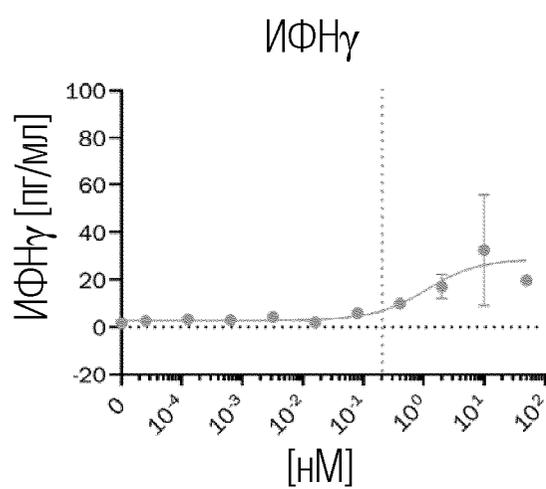


E



ФИГ. 18 (продолжение)

Ф



ФИГ. 19

