

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392188 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.12

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.28

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С ЗАРЯЖЕННЫМИ ПАРАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/146,334; 63/260,463

(32) 2021.02.05; 2021.08.20

(33) US

(86) PCT/US2022/070394

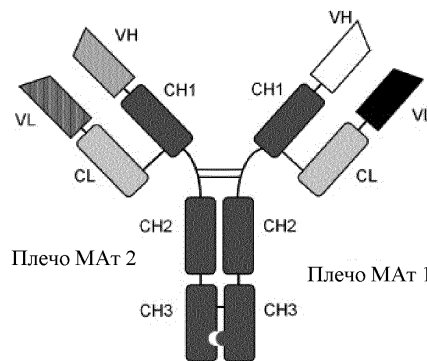
(87) WO 2022/170305 2022.08.11

(71) Заявитель:
ФАНЕС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ли Джек Чунъян, Цзя Хайцюнь, Цзоу Хуэй, У Хуэйвэнь, Ван Минхань (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описаны сконструированные биспецифические антитела с заряженными парами, интродуцированными на границу раздела CH1 и CL индивидуально или в комбинации с другими заряженными парами на границе раздела VH и VL. Описаны также биспецифические антитела анти-CD47/анти-CLDN18.2 и анти-CD3/анти-DLL3 и их антигенсвязывающие фрагменты. Описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические антитела, композиции, содержащие биспецифически антитела, и способы получения биспецифических антител и применения биспецифических антител для лечения или предупреждения заболеваний, таких как рак и/или связанные с ним осложнения.



A1

202392188

202392188

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С ЗАРЯЖЕННЫМИ ПАРАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 63/146334, поданной 5 февраля 2021 г., и предварительной заявки на патент № 63/260463, поданной 20 августа 2021 г. Содержание каждой из них в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

10

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к сконструированным биспецифическим антителам, которые содержат созданные заряженные остатки на границе раздела между тяжелой цепью и легкой цепью. Изобретение относится к заряженным парам, биспецифическим антителам, которые содержат заряженные пары, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим биспецифические антитела, рекомбинантным клеткам, которые содержат векторы, и композициям, содержащим биспецифические антитела. Предложены также способы скрининга и применения конструкцией заряженных пар, которые позволяют различать физические свойства биспецифических антител и их основных примесей в процессе производства, получения биспецифических антител, а также способы применения биспецифических антител для лечения заболеваний, включая рак и/или связанные с ним осложнения.

15

20

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

25

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла "065799.35WO1 Sequence Listing" и датой создания 10 декабря 2021 г. и размером 80 КБ. Перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и в полном объеме включен в настоящее описание в качестве ссылки.

30

Предпосылки создания изобретения

Антитела (иммуноглобулины) представляют собой встречающиеся в естественных условиях белки, которые играют важные роли в функции иммунной системы, связанной с защитой организма от чужеродных субстанций, таких как бактерии и вирусы. По своей нативной структуре антитела представляют собой Y-образный белок, состоящий из двух плеч, каждое из которых содержит идентичную тяжелую цепь (HC) и идентичную легкую цепь (LC). Тяжелая цепь содержит одну переменную область (VH) и три константных участка (CH1, CH2 и CH3 соответственно), которые в направлении от N-конца к C-концу расположены в следующем порядке: VH, CH1, CH2 и CH3, а легкая цепь содержит одну переменную область (VL) и один константный участок (CL), которые в направлении от N-конца к C-концу расположены в следующем порядке: VL и CL. Ассоциация тяжелой цепи и легкой цепи в каждом плече, которую, как правило обозначают понятием "спаривание", включает VH, CH1, VL и CL. VH и VL физически взаимодействуют друг с другом с образованием домена антитела, связывающегося с его антигеном, таким образом, имеющее Y-форму антитело содержит два идентичных связывающих домена, по одному в каждом плече, которые связываются с одним и тем же антигеном, и поэтому является двухвалентным и моноспецифическим, что является типичной характерной особенностью моноклонального антитела (МАт).

Являясь частью структуры антитела, CH1 и CL также физически взаимодействуют друг с другом, что включает физические контакты, а также межцепочечную дисульфидную связь (которую обозначают также как "дисульфидный мостик"), образуемую с помощью свободных тиольных групп двух нативных цистеинов на CH1 и CL соответственно. Межцепочечная дисульфидная связь способствуют стабилизации общей структуры, образованной тяжелой цепью и легкой цепью на каждом плече. Кроме того, образуются также внутрицепочечные дисульфидные связи, представляющие собой часть нативной структуры антитела. С-концы тяжелых цепей (CH2 и CH3) образуют плотную структуру, важную для обеспечения двухвалентности нативного антитела.

Моноклональные антитела (МАт) известны в качестве прекрасной белковой терапевтической платформы благодаря их высокой аффинности связывания с

антигенами, длительному периоду полужизни *in vivo*, стабильной структуре в естественных условиях, способности активировать иммунную систему против мишеней лекарственных средств и многим другим аспектам. Однако, если для осуществления терапевтических стратегий требуется таргетирование двух

5 различных антигенов, таких как два опухолеспецифических антигена на одной и той же раковой клетке, с использованием одного антитела, то МАт не могут служить для указанной цели. В таких случаях создают биспецифическое антитело, предназначенное для таргетирования двух различных антигенов на

10 одной и той же клетке, одно из плечей которого связывается с первым антигеном, а другое плечо связывается со вторым антигеном. Хотя связывание с каждым антигеном является одновалентным, связывание с обоими антигенами на одной и той же клетке может компенсировать потерю avidности из-за утраты двухвалентности по отношению к каждому антигену. Биспецифические антитела

15 обладают повышенной по сравнению с МАт селективностью, поскольку они сильнее связываются с клетками, экспрессирующими оба антигена, по сравнению с клетками, экспрессирующими только один из антигенов. Это особенно важно для снижения опасений по поводу безопасности, когда здоровые клетки или ткани экспрессируют один из двух антигенов. Биспецифические антитела могут таргетировать одновременно два пути, когда они связываются с

20 двумя различными антигенами клеточной поверхности или растворимыми лигандами/белками, что является другим преимуществом по сравнению с МАт. Биспецифические антитела, которые связываются с одним антигеном на одной клетки и другим антигеном на второй клетке, можно применять в качестве привлекающих клетки активаторов (таких как привлекающие Т-клетки

25 активаторы) для объединения двух клеток и запуска предполагаемых биологических действий для достижения терапевтической цели.

Если биспецифическое антитело получают из двух МАт, то продукт может содержать два различных плеча из двух МАт соответственно, в котором каждое из плечей имеет уникальную тяжелую цепь и уникальную легкую цепь. При

30 осуществлении экспрессии биспецифического антитела в клетках-продуцентах в процессе производства требуется экспрессия 4 различных белков: двух различных тяжелых цепей и двух различных легких цепей. Хотя цель состоит в том, чтобы в процессе производства каждая НС спаривалась с соответствующей

LC на каждом плече биспецифического антитела, как правило, возникают ошибочные спаривания (LC одного плеча спаривается соединяется с HC другого плеча) и образуются нежелательные продукты, что затрудняет получение и выделение требуемого продукта в виде биспецифического антитела. Для улучшения производства биспецифических антител использовали несколько подходов. Одним из примеров является идентификация общей легкой цепи в процессе конструирования белка. Однако обмен доменов и многие мутации, применяемые в белковой инженерии, могут значительно изменять нативную структуру антител, что может увеличивать риск агрегации и/или снижения стабильности.

Привлекающие T-клетки активаторы представляют собой мультиспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, состоящие по меньшей мере из двух связывающих доменов, при этом один домен связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТAA), который экспрессируется на поверхности раковой клетки, а другой домен связывается с поверхностной молекулой T-клетки, активируя T-клетку. Хотя известно применение различных связывающих T-клетки доменов в качестве активирующего компонента, широкое применение в качестве привлекающих T-клетки активаторов нашли анти-CD3-связывающие домены. Биспецифические антитела к CD3 нашли широкое применение в качестве привлекающих T-клетки иммунотерапевтических агентов для рекрутинга T-клеток к опухолевым клеткам для облегчения уничтожения раковых клеток.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из основных объектов изобретения являются выделенные биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие:

- а. первую тяжелую цепь, H1;
 - б. вторую тяжелую цепь, H2;
 - в. первую легкую цепь, L1; и
 - г. вторую легкую цепь, L2,
- в которых H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с первым антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, и

в которых H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается со вторым антигеном, предпочтительно со вторым антигеном человеческого происхождения, в которых

5 (а) H1 и H2 каждая содержит CH1-участок человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; и

(б) L1 и L2 каждая содержит CL-участок человеческой легкой каппа-цепи или человеческой легкой лямбда-цепи;

10 в которых H1L1 и H2L2 каждая содержит заряженную пару, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1-участке H1 и S114K/R в CL-участке L1 соответственно и G166K/R в CH1-участке H2 и S114D/E в CL-участке L2 соответственно;

15 (2) T187D/E в CH1-участке H1 и D/N170K/R в CL-участке L1 соответственно и T187K/R в CH1-участке H2 и D/N170D/E в CL-участке L2 соответственно;

(3) S131D/E в CH1-участке H1 и P119K/R в CL-участке L1 соответственно и S131K/R в CH1-участке H2 и P119D/E в CL-участке L2 соответственно;

(4) A129D/E в CH1-участке H1 и S121K/R в CL-участке L1 соответственно и A129K/R в CH1-участке H2 и S121D/E в CL-участке L2 соответственно;

20 (5) G166D/E в CH1-участке H2 и S114K/R в CL-участке L2 соответственно и G166K/R в CH1-участке H1 и S114D/E в CL-участке L1 соответственно;

(6) T187D/E в CH1-участке H2 и D/N170K/R в CL-участке L2 соответственно и T187K/R в CH1-участке H1 и D/N170D/E в CL-участке L1 соответственно;

25 (7) S131D/E в CH1-участке H2 и P119K/R в CL-участке L2 соответственно и S131K/R в CH1-участке H1 и P119D/E в CL-участке L1 соответственно; или

(8) A129D/E в CH1-участке H2 и S121K/R в CL-участке L2 соответственно и A129K/R в CH1-участке H1 и S121D/E в CL-участке L1 соответственно.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения две тяжелые цепи H1 и H2 каждая содержит VH-область, CH1-участок и Fc-область (которая содержит CH2- и CH3-участки), в которых VH-области имеют различные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения две тяжелые цепи H1 и H2 каждая содержит VH-область, CH1-участок и Fc-область

(которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых СН1-участки имеют различные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения две тяжелые цепи Н1 и Н2 каждая содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых Fc-области имеют различные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых VL-области имеют различные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых CL-участки имеют различные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Н1 и Н2 образуют гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) интродуцируют в G166, T187, S131 или A129 в СН1-участке Н1 (при этом положительно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL-участке L1, как описано выше) и положительно заряженную аминокислоту (K или R) интродуцируют в соответствующий остаток в СН1-участке Н2 (при этом отрицательно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL-участке L2, как описано выше), VH -область Н1 и VL-область L1 имеют замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно, а VH-область Н2 и VL-область L2 имеют замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно; или положительно заряженную аминокислоту (K или R) интродуцируют в G166, T187, S131 или A129 в СН1 Н1-цепи (при этом отрицательно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL-участке L2, как описано выше) и отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) интродуцируют в соответствующий остаток в СН1-участке Н2 (при этом положительно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL-участке L2, как описано выше), VH-область Н1 и VL-область L1 имеют замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно, и VH-область Н2 и VL-область L2 имеют замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит СН1- и CL-участки одного из двух плечей, содержащие аминокислотные замены аминокислотного остатка в соответствующем аминокислотном положении в SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20 в случае СН1 и SEQ ID NO: 21 или 22 в случае CL, где аминокислотные замены в СН1- и CL-участках выбирают из:

- (1) K133C и C220X в СН1 и F209C и C214X в CL;
 - (2) R133C и C131X в СН1 и F209C и C214X в CL;
 - (3) R133C и C131X в СН1 и V209C и C214X в CL; или
 - 10 (4) K133C и C220X в СН1 и V209C и C214X в CL,
- где X выбирают из S, A или G.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, плечо, содержащее антитело к ТАА или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом CD47 и ТАА экспрессируются на одной и той же клетке, и обладает способностью специфически связываться и с CD47, и с ТАА, предпочтительно человеческими CD47 и ТАА. Выделенное антитело к CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать, например, VH, СН1, VL и CL, 20 которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD47, 25 предпочтительно человеческим CD47, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с клаудином 18.2 (CLDN18.2), предпочтительно человеческим CLDN18.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD47 антигенсвязывающий домен содержит VH, СН1, VL и CL, которые содержат 30 следующие аминокислотные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 29 соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 29 соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 30 соответственно;

- (4) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 30 соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 33 соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 33 соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 34 соответственно;
- 5 (8) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 34 соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 37 соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 37 соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 38 соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 38 соответственно;
- 10 (13) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 41 соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 41 соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 42 соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 42 соответственно;
- (17) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 45 соответственно;
- 15 (18) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 45 соответственно;
- (19) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 46 соответственно;
- (20) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 46 соответственно;
- (21) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 49 соответственно;
- (22) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 49 соответственно;
- 20 (23) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 50 соответственно;
- (24) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 50 соответственно;
- (25) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 53 соответственно;
- (26) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 53 соответственно;
- (27) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 54 соответственно;
- 25 (28) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 54 соответственно;
- (29) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 57 соответственно;
- (30) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 57 соответственно;
- (31) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 58 соответственно;
- (32) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 58 соответственно;
- 30 (33) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 29 соответственно;
- (34) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно;
- (35) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 30 соответственно;
- (36) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 30 соответственно;

- (37) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 33 соответственно;
- (38) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 33 соответственно;
- (39) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 34 соответственно;
- (40) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 34 соответственно;
- 5 (41) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 37 соответственно;
- (42) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 37 соответственно;
- (43) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 38 соответственно;
- (44) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 38 соответственно;
- (45) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 41 соответственно;
- 10 (46) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 41 соответственно;
- (47) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 42 соответственно;
- (48) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 42 соответственно;
- (49) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 45 соответственно;
- (50) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 45 соответственно;
- 15 (51) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 46 соответственно;
- (52) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 46 соответственно;
- (53) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 49 соответственно;
- (55) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 49 соответственно;
- (55) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 50 соответственно;
- 20 (56) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 50 соответственно;
- (57) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 53 соответственно;
- (58) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 53 соответственно;
- (59) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 54 соответственно;
- (60) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 54 соответственно;
- 25 (61) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 57 соответственно;
- (62) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 57 соответственно;
- (63) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 58 соответственно; или
- (64) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 58 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное

30 биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело анти-CD47/анти-CLDN18.2, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, а второй

антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 1, 28, 2, 29, 3, 63, 4 и 64 соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 1, 36, 2, 37, 3, 67, 4 and 68 соответственно;
- 5 (3) SEQ ID NO: 1, 44, 2, 45, 3, 71, 4 и 72 соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 1, 52, 2, 53, 3, 73, 4 и 74 соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 1, 31, 2, 34, 3, 65, 4 и 66 соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 1, 39, 2, 42, 3, 69, 4 и 70 соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 1, 47, 2, 50, 3, 75, 4 и 76 соответственно;
- 10 (8) SEQ ID NO: 1, 55, 2, 58, 3, 77, 4 и 78 соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 23, 28, 24, 29, 59, 63, 60 и 64 соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 23, 36, 24, 37, 59, 67, 60 и 68 соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 23, 44, 24, 45, 59, 71, 60 и 72 соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 23, 52, 24, 53, 59, 73, 60 и 74 соответственно;
- 15 (13) SEQ ID NO: 25, 31, 26, 34, 61, 65, 62 и 66 соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 25, 39, 26, 42, 61, 69, 62 и 70 соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 25, 47, 26, 50, 61, 75, 62 и 76 соответственно; или
- (16) SEQ ID NO: 25, 55, 26, 58, 61, 77, 62 и 78 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное
20 биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к модулятору иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент, и обладает способностью специфически связываться с ICM, предпочтительно человеческим ICM. ICM можно выбирать, например, из группы, которая состоит из CD3, CD16, CD27, CD28, CD40, CD122,
25 NKp46, OX40, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, SIGLEC7, SIGLEC9, KIR, BTLA, B7-H3, и других расположенных на клеточной поверхности регулирующих иммунитет молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к ICM или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело к CD3 или его
30 антигенсвязывающий фрагмент и обладает способностью специфически связываться с CD3, предпочтительно человеческим CD3. Выделенное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать, например, VH,

CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3, предпочтительно человеческим CD3, а второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно, а второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16 соответственно.

Предложены также выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие предлагаемые в изобретении биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые представлены в настоящем описании.

Предложены также векторы, которые содержат выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие предлагаемые в изобретении биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые представлены в настоящем описании.

Предложены также клетки-хозяева, содержащие векторы, которые содержат выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие предлагаемые в изобретении биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые представлены в настоящем описании.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей выделенные биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предлагаемые в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Предложены также способы таргетирования CD47 и ТАА (такого, например, как CLDN18.2), которые оба экспрессируются на поверхности

раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, путем активации опосредуемого макрофагами фагоцитоза раковой клетки, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

Предложены также способы таргетирования DLL3, который
5 экспрессируется на поверхности раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, путем привлечения Т-клеток, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

Предложены также способы таргетирования одного или двух антигенов,
10 которые экспрессируются на поверхности раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, включающие использование индуцированной блокадой CD47 активации опосредуемого макрофагами фагоцитоза или опосредуемой CD3 активации Т-клеток, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

Предложены также способы лечения рака у субъекта, который нуждается в
15 этом, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении. Рак может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, его можно выбирать из (но не ограничиваясь только ими) рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака ободочной кишки,
20 гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL),
25 хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелолейкоза (CLL), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Предложены также способы получения выделенного биспецифического
30 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предлагаемого в изобретении, включающие культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Предложены также способы получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, предлагаемый в изобретении, включающие объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, а также следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения станут более понятными после ознакомления в сочетании с прилагаемыми чертежами. Однако, как должно быть очевидно, что заявка на ограничена конкретными вариантами осуществления, представленными на чертежах.

На чертежах показано:

на фиг. 1 - схематическая структура биспецифического антитела (БсАт) с плечом МАт 1 и плечом МАт 2. Оба плеча имеют разные VH-области тяжелых цепей и VL-области легких цепей; в настоящем примере подразумевается, что тяжелые цепи (НС) и легкие цепи (LC) биспецифического антитела имеют каркас IgG1 и каппа соответственно. Мутации "Knob in the hole (KiH)" ("выступ во впадину") интродуцированы в СН3-участки обеих НС, что способствует образованию гетеродимера. Кроме того, остаток цистеина был интродуцирован в каждый из двух СН3-участков соответственно, что способствует образованию межцепочечной дисульфидной связи, стабилизирующей гетеродимер. Н1 и L1 представляют собой тяжелую и легкую цепь плеча МАт 1 соответственно, а Н2 и L2 представляют собой тяжелую и легкую цепь плеча МАт 2 соответственно;

на фиг. 2А-2Е - последовательности различных компонентов антител. На фиг. 2А проиллюстрировано выравнивание СН1-участков человеческих IgG1 (SEQ ID NO: 17), IgG2 (SEQ ID NO: 18), IgG3 (SEQ ID NO: 19) и IgG4 (SEQ ID NO: 20). На фиг. 2Б проиллюстрировано выравнивание CL-участков человеческих легких каппа-цепей (SEQ ID NO: 21) и лямбда-цепей (SEQ ID NO: 22). На фиг. 2В-2Г представлены последовательности VH (фиг. 2В) и VL (фиг.

2Г) анти-CD47 МАт (VH: SEQ ID NO: 1; VL: SEQ ID NO: 2) и анти-CLDN18.2 МАт (VH: SEQ ID NO: 3; VL: SEQ ID NO: 4). На фиг. 2Д-2Е представлены последовательности VH (фиг. 2Д) и VL (фиг. 2Е) анти-CD3 МАт (VH: SEQ ID NO: 5; VL: SEQ ID NO: 6) и анти-DLL3 МАт (VH: SEQ ID NO: 7; VL: SEQ ID NO: 8). Выделены CDR-участки, которые определяли методом Кэбота, *
5 обозначает сайты известных аллельных вариаций;
на фиг. 3А-3С - результаты анализов биспецифических антител, сконструированных с различными заряженными парами, полученные с использованием стандартного соотношения (1:1) для трансфекции. На фиг. 3А-
10 3Б показаны результаты мостикового ELISA-анализа очищенных с помощью белка А образцов из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител. На фиг. 3В-3О показаны результаты анализов, полученные с помощью СЕХ-ЖХВР (катионообменная хроматография на основе жидкостной хроматографии высокого разрешения), очищенных с
15 помощью белка А образцов из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител или трансфектированных стандартами основных примесей для конструкций биспецифических антител. На фиг. 3П-3С показаны результаты анализов, полученные с помощью жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС), очищенных с помощью белка А
20 образцов из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител. WT, биспецифическое антитело с плечами анти-CD47 (плечо МАт 1) и анти-CLDN18.2 (плечо МАт 2), соответствуют указанным на фиг. 1; другие биспецифические антитела содержали модификации по сравнению с WT-конструкцией, которая указана в
25 таблице 3. Создавали стандарты основных примесей для каждой биспецифической конструкции и анализировали с помощью СЕХ-ЖХВР параллельно с указанным биспецифическим антителом: гомодимер/полумолекула анти-CD47 с "выступом", очищенный с помощью белка А образец из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных HC и LC анти-CD47-плеча созданного
30 биспецифического антитела; гомодимер/полумолекула анти-CLDN18.2 с "впадиной", очищенный с помощью белка А образец из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных HC и LC анти-CLDN18.2-плеча созданного биспецифического антитела; ошибочное спаривание 2Х анти-CD47 LC

(обозначено также как 2X анти-CD47 LC), очищенный с помощью белка А образец из среды клеток ExpiCHO-S, трансфектированных HC и LC анти-CD47-плеча созданного биспецифического антитела и анти-CLDN18.2-плеча созданного биспецифического антитела; ошибочное спаривание 2X анти-
5 CLDN18.2 LC (обозначено также как 2X анти-CLDN18.2 LC), очищенный с помощью белка А образец из среды ExpiCHO-S, трансфектированных HC и LC анти-CLDN18.2-плеча и HC анти-CD47-плеча созданного биспецифического антитела;

на фиг. 4А-4М - результаты анализа биспецифических антител,
10 сконструированных с различными заряженными парами "ЕК", при использовании для трансфекции смещенного соотношения ДНК. На фиг. 4А показаны результаты мостикового ELISA-анализа очищенных с помощью белка А образцов из среды ExpiCHO-S-клеток, трансфектированных с использованием смещенного соотношения ДНК указанных конструкций биспецифических
15 антител. На фиг. 4Б показаны результаты СЕХ-ЖХВР-анализов очищенных с помощью белка А образцов. На фиг. 4В-4Г показаны результаты ЖХ/МС-анализов очищенных с помощью белка А образцов из среды ExpiCHO-S-клеток, трансфектированных с использованием смещенного соотношения ДНК указанных конструкций биспецифических антител. На фиг. 4Д-4Е показаны
20 результаты СЕХ-FPLC-анализов (катионообменная хроматография на основе быстрой жидкостной хроматографии белков) указанных очищенных с помощью белка А образцов биспецифических антител при использовании линейного градиента рН. На фиг. 4Ж показаны результаты мостикового ELISA-анализа образцов из различных пиков, указанных на фиг. 4Д-4Е. На фиг. 4З-4М показаны
25 результаты ЖХ/МС-анализов пиков, полученных с помощью СЕХ-FPLC-хроматографии, представленных на фиг. 4Д-4Е;

на фиг. 5А-5Е - результаты анализов биспецифических антител,
сконструированных с различными заряженными парами "КЕ" при использовании для трансфекции стандартного соотношения ДНК. На фиг. 5А показаны
30 результаты СЕХ-FPLC-анализа указанных очищенных с помощью белка А образцов биспецифических антител при использовании линейного градиента рН. На фиг. 5Б показаны результаты мостикового ELISA-анализа образцов из различных пиков, представленных на фиг. 5А. На фиг. 5В-5Е показаны

результаты ЖХ/МС-анализов пиков, полученных с помощью СЕХ-FPLC-хроматографии, представленных на фиг. 5А;

на фиг. 6А-6Е – результаты поэтапной СЕХ-FPLC-очистки и анализов биспецифических антител с заряженными парами "ЕК". Очищенные с помощью белка А образцы из среды Ехр1СНО-S-клеток, трансфектированных с использованием смещенного соотношения ДНК различными конструкциями биспецифических антител, анализировали с помощью СЕХ-FPLC, и оптимизированный поэтапный метод очистки применяли для очистки каждого биспецифического антитела (фиг. 6А). Образец из каждого пика, полученного при поэтапной СЕХ-FPLC, представленного на фиг. 6А, анализировали с помощью мостикового ELISA-анализа в отношении биспецифической активности (фиг. 6Б), и чистоту каждого пика анализировали с использованием ЖХ/МС (фиг. 6В-6Е);

на фиг. 7А-7Л - результаты анализов биспецифических антител, сконструированных с различными заряженными парами "екЕК" или "кеКЕ". На фиг. 7А показан результат, полученный с помощью мостикового ELISA-анализа очищенных с помощью белка А образцов из среды Ехр1СНО-S-клеток, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител. На фиг. 7Б-7И показаны результаты СЕХ-ЖХВР-анализов очищенных с помощью белка А образцов из среды Ехр1СНО-S-клеток, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител или стандартами соответствующих им основных примесей. На фиг. 7К-7Л показаны результаты ЖХ/МС-анализов очищенных с помощью белка А образцов из среды Ехр1СНО-S-клеток, трансфектированных указанными конструкциями биспецифических антител;

на фиг. 8А-8М - результаты СЕХ-FPLC-анализов указанных очищенных с помощью белка А биспецифических антител с заряженными парами "екЕК" или "кеКЕ" и результаты мостикового ELISA и ЖХ/МС-анализов каждого пика. На фиг. 8А и 8Ж показаны результаты СЕХ-FPLC-анализов биспецифических антител с "екЕК" и "кеКЕ" соответственно, полученные с помощью линейного градиента рН. На фиг 8Б и 8З показаны результаты мостикового ELISA-анализа образцов из различных пиков, представленных на фиг 8А и 8Ж соответственно. На фиг. 8В-8Е показаны результаты ЖХ/МС-анализов пиков, полученных с помощью СЕХ-FPLC-хроматографии, представленных на фиг. 8А. На фиг. 8И-8М

показаны результаты ЖХ/МС-анализов пиков, полученных с помощью СЕХ-FPLC-хроматографии, представленных на фиг. 8Ж;

на фиг. 9А-9К – результаты поэтапной СЕХ-FPLC-очистки указанных очищенных с помощью белка А биспецифических антител с заряженными парами и результаты мостикового ELISA-анализа и ЖХ/МС-анализа каждого пика. Очищенные с помощью белка А образцы из среды клеток EpxiCHO-S, трансфектированных различными конструкциями биспецифических антител, анализировали с помощью СЕХ-FPLC, и оптимизированный поэтапный метод очистки применяли для очистки каждого биспецифического антитела (фиг. 9А и 9Д). Образец из общего пика, полученного с помощью поэтапной СЕХ-FPLC-хроматографии и представленного на фиг. 9А и 9Д, анализировали с помощью мостикового ELISA-анализа в отношении биспецифической активности (фиг. 9Б и 9Е) и чистоту каждого пика анализировали с использованием ЖХ/МС (фиг. 9В-9Г и 9Ж-9К);

на фиг. 10А-10В - данные о чистоте биспецифического антитела анти-CD3/анти-DLL3 bsAb_33, полученные с использованием различных аналитических методов. На фиг. 10А показаны результаты, полученные с помощью НИС-(хроматография с гидрофобным взаимодействием) ЖХВР-анализа очищенного bsAb_33 с несколькими применяемыми для сравнения стандартами примесей; на фиг. 10Б - результаты, полученные с помощью ЖХВР-анализа с сильным катионным обменом (SCX) очищенного bsAb_33 с несколькими применяемыми для сравнения стандартами примесей; на фиг. 10В - результаты, полученные с помощью SEC-(гель-фильтрация) ЖХВР-анализа очищенного bsAb_33;

на фиг. 11А-11Б- результаты анализа с использованием биспецифического антитела анти-CD3/анти-DLL3 bsAb_33. На фиг. 11А показаны данные, демонстрирующие перекрестное сшивание SHP-77-клеток (экспрессирующих DLL3) и Jurkat-клеток (экспрессирующих CD3) с помощью биспецифического антитела анти-CD3/анти-DLL3 bsAb_33. На фиг. 11Б показаны данные об активации репортерных клеток Jurkat (экспрессирующих CD3) в присутствии SHP-77-клеток (экспрессирующих DLL3), опосредованной биспецифическим антителом анти-CD3/анти-DLL3 bsAb_33. Блокирующее DLL3 МАт представляет

собой версию МАт, анти-DLL3-плечо bsAb_33; блокирующее CD3 МАт представляет собой версию МАт, анти-CD3-плечо bsAb_33.

Подробное описание изобретения

5 В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте спецификации процитированы или описаны различные публикации, статьи и патенты; содержание каждого из документов в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. В настоящую спецификацию включено обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т.п. для пояснения контекста настоящего изобретения. Указанное обсуждение не является 10 признанием того, что какой-либо из этих вопросов или все они являются частью известного уровня техники в отношении любых описанных или указанных в формуле изобретения признаков.

Если не указано иное, то все технические и научные понятия, используемые в настоящем описании, имеют то значение, которое известно обычному 15 специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. В противном случае, некоторые понятия, используемые в настоящем описании, имеют значения, указанные в спецификации.

Следует отметить, что в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения применение понятия в единственном числе включает его 20 применение во множественном числе, если из контекста четко не следует иное.

Если не указано иное, то подразумевается, что все численные значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, указанные в настоящем описании, во всех случаях можно корректировать понятием "примерно". Таким образом, численное значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от приведенного 25 значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает значения от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогично этому, диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает значения от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего описания использование численного диапазона специально включает все возможные поддиапазоны, все отдельные численные значения в пределах этого 30 диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если из контекста четко не следует иное.

Если не указано иное, то понятие "по меньшей мере", предшествующее ряду элементов, следует понимать как относящееся к каждому элементу в ряду.

Специалистам в данной области должно быть очевидно или они могут установить с помощью не более чем общепринятых экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании. Подразумевается, что такие эквиваленты подпадают под
5 объем изобретения.

Как должно быть очевидно, применяемые в контексте настоящего описания понятия "содержит", "содержащий", "включает", включающий", "имеет", "имеющий", "состоит" или "состоящий" или любые другие их варианты подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но
10 не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и являются не исключающими или открытыми понятиями. Например, композиция, смесь, процесс, метод, изделие или устройство, которые содержат ряд элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или присущие таким
15 композиции, смеси, процессу, методу, продукту или устройству. Кроме того, если прямо не указано обратное, то "или" рассматривается как включающее «или», а не исключающий союз "или". Например, условие А или В удовлетворяет любому из следующих вариантов: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или
20 присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

В контексте настоящего описания упоминание союза "и/или" между несколькими перечисленными элементами следует понимать как охватывающее как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены союзом "и/или", то первый вариант относится к возможности
25 применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения вместе и первого, и второго элемента. Подразумевается, что в контексте настоящего описания любой из этих вариантов соответствует смыслу и, следовательно, подпадает под понятие "и/или".
30 Подразумевается также, что одновременное применение более чем одного из вариантов также соответствует смыслу и, следовательно, подпадает под понятие "и/или".

В настоящем описании в спецификации и формуле изобретения подразумевается, что понятие "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из" относится к включению любого указанного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному методу, структуре или композиции.

В настоящем описании в спецификации и формуле изобретения подразумевается, что понятие "состоит практически из" или его варианты, такие как "состоят практически из" или "состоящий практически из" относится к включению любого указанного целого числа или группы целых чисел и необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного метода, структуры или композиции (см. М.Р.Е.Р. § 2111.03).

В контексте настоящего описания понятие "субъект" относится к любому животному, предпочтительно млекопитающему, наиболее предпочтительно человеку. В контексте настоящего описания понятие "млекопитающее" включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают (но не ограничиваясь только ими) коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, кроликов, морских свинок, обезьян, людей, более предпочтительно человека.

Слова "правый", "левый", "нижний" и "верхний" обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия "примерно", "приблизительно", "в целом", "по существу" и подобные понятия, применяемые при ссылке на размер или характеристику предпочтительного компонента изобретения, указывают на то, что описанный/описанная размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от них, которые функционально являются такими же или похожими, что должно быть очевидно обычному специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, которые включают численный параметр, должны включать изменения, которые, с учетом математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки,

производственные допуски и т.д.), не приводили бы к изменению ни на одну младшую значащую цифру.

В настоящем описании в спецификации и формуле изобретения понятия "различные тяжелые цепи" или "различные легкие цепи" указывают на то, что
5 тяжелые или легкие цепи имеют последовательности, которые не идентичны друг другу.

Понятия "идентичные" или процент "идентичности" в контексте двух или большего количества нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, биспецифических антител, антител к CD3, антител к DLL3, антител к CD47, антител к CLDN18.2, биспецифических
10 антител анти-CD3/анти-DLL3, биспецифических антител анти-CD47/анти-CLDN18.2, полипептидов DLL3 и кодирующих их полинуклеотидов, полипептидов CD3 и кодирующих их полинуклеотидов, полипептидов CD47 и кодирующих их полинуклеотидов и полипептидов CLDN18.2 и кодирующих их
15 полинуклеотидов) относятся к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании при сравнении и выравнивании для достижения максимального соответствия, измеренного с
20 использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального обследования.

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность рассматривается в качестве эталонной последовательности, с которой
25 сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости задают координаты подпоследовательности и программные параметры алгоритма сравнения последовательности. Затем алгоритм сравнения последовательностей позволяет
30 вычислять процент идентичности последовательности для тестируемой(ых) последовательности(ей) относительно эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальное для сравнения выравнивание последовательностей можно осуществлять, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith и

Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 1981, с. 482, алгоритма выравнивая для определения гомологии Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 1970, с. 443, с помощью метода поиска сходства Pearson и Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85, 1988, с. 2444), с помощью компьютеризированных реализаций этих
5 алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA см. в: Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, шт. Висконсин) или путем визуального обследования (см. общие сведения в: Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F.M. Ausubel и др., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).
10

Примерами алгоритмов, которые можно применять для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410 и Altschul и др., Nucleic Acids Res. 25, 1997, сс.
15 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST находится в открытом доступе через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). Это алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем идентификации коротких слов длины W в запрашиваемой
20 последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговое значение оценки соседнего слова (Altschul и др., выше). Эти начальные совпадения по соседним словам служат отправной точкой для инициирования поиска более
25 длинных HSP, содержащих их. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличен совокупный балл.

Совокупные баллы рассчитывают с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров M (балл вознаграждения за пару совпадающих
30 остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей используют оценочную матрицу для вычисления совокупного балла. Повторение совпадений слов в каждом направлении приостанавливается, когда: совокупный балл выравнивания

уменьшается на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл становится равным нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигается конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используется по умолчанию длина слова (W), равная 11, математическое ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$, и происходит сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP используется по умолчанию длина слова (W), равная 3, математическое ожидание (E), равное 10, и оценочная матрица BLOSUM62 (см. Henikoff и Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1989, с.10915).

Помимо расчета процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST позволяет осуществлять также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin и Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5787). Одним из показателей сходства, обеспечиваемых алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая дает представление о вероятности случайного совпадения двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее чем примерно 0,1, более предпочтительно менее чем примерно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем примерно 0,001.

Дополнительным показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот или два полипептида являются практически идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, что будет описано ниже. Так, полипептид, как правило, является практически идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются друг от друга только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются

практически идентичными, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другим в строгих условиях.

В контексте настоящего описания понятие "полинуклеотид", синонимом которого является "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают (но не ограничиваясь только ими) одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или более часто являются двухцепочечными или представляют собой смесь одно- и двухцепочечных участков. Кроме того, понятие "полинуклеотид" относится к трехцепочечным участкам, содержащим РНК или ДНК или РНК, и ДНК. Понятие "полинуклеотид" включает также ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с каркасами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. "Модифицированные основания" включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; таким образом, понятие "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые, как правило, встречаются в естественных условиях, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Под понятие "полинуклеотид" подпадают также нуклеиновые кислоты с относительно короткими цепями, которые часто обозначают как олигонуклеотиды.

В контексте настоящего описания понятие "вектор" означает репликон, в который другой сегмент нуклеиновой кислоты может быть функционально встроен таким образом, чтобы обеспечивать репликацию или экспрессию сегмента.

В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, предлагаемую в

изобретении. "Клетка-хозяин" может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В одном из вариантов осуществления изобретения "клетка-хозяин" представляет собой клетку, трансфектированную молекулой нуклеиновой кислоты, предлагаемой в изобретении. В другом варианте осуществления изобретения "клетка-хозяин" представляет собой потомство или возможное потомство указанной трансфектированной клетки. Потомство клетки может быть или может не быть идентичным родительской клетке, например, в результате мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут возникать в следующих поколениях или при интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

В контексте настоящего описания понятие "экспрессия" относится к биосинтезу генного продукта. Под понятие подпадает транскрипция гена в РНК. Под понятие подпадает также трансляция РНК в один или несколько полипептидов, и подпадают также все встречающиеся в естественных условиях пост-транскрипционные и пост-трансляционные модификации. Экспрессируемое биспецифическое антитело может находиться внутри цитоплазмы клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или может быть прикреплено к клеточной мембране.

В контексте настоящего описания понятие "пептид", "полипептид" или "белок" относится к молекуле, состоящей из аминокислот, и может рассматриваться специалистом в данной области как белок. В настоящем описании для обозначения аминокислотных остатков применяют общепринятые однобуквенные или трехбуквенные коды. Понятия "пептид", "полипептид" и "белок" можно применять взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться не относящимся к аминокислотам компонентом. Под понятия подпадает полимер аминокислот, модифицированный в естественных условиях или в результате вмешательства человека; например, путем образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с маркирующим компонентом. Под определение подпадают также, например,

полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (включая, например, не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области.

Пептидные последовательности, указанные в настоящем описании, записывают принятым образом, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область - справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, в настоящем описании, если специально не указано иное, рассматривается L-форма аминокислот.

В контексте настоящего описания понятие "CD47" относится к многопроходному трансмембранному рецептору, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулинов, для которого известно, что он участвует в множестве процессах в клетке, включая миграцию, адгезию клеток, и T-клеточную функцию. CD47, известный также к качестве интегрин-ассоциированного белка (IAP), антигена рака яичников (OА3), Rh-родственного антигена и MER6, первоначально был идентифицирован как опухолевый антиген при раке яичников человека и впоследствии было установлено, что он экспрессируется во многих типах опухолей человека, включая как гематологические, так и солидные опухоли. Взаимодействие между CD47 и сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α), ингибирующим белком, который экспрессируется на макрофагах, предупреждает фагоцитоз CD47-экспрессирующих клеток. Кроме того, низкие уровни экспрессии CD47 характерны практически для всех незлокачественных клеток. Понятие "человеческий CD47" относится к CD47, имеющему происхождение из организма человека. Пример аминокислотной последовательности человеческого CD47 представлен в GenBank под регистрационным № NP_001768.1.

В контексте настоящего описания понятие "CLDN18.2" относится к (сплайс)-варианту 2 клаудина 18, клаудину 18.2, клаудину-18.2 или клаудину-18a2.1, который принадлежит к клаудиновому семейству трансмембранных белков. CLDN18.2 специфически экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток в желудке (Niimi и др., Mol Cell Biol. 21, 2001, сс. 7380-7390) и становится одним из основных структурных компонентов плотного соединения между эпителиальными клетками (Sahin и др., Physiol Rev. 93, 2013, сс. 525-569). Понятие "человеческий CLDN18.2" относится к CLDN18.2,

имеющему происхождение из организма человека. Пример аминокислотной последовательности человеческого CLDN18.2 представлен в GenBank под регистрационным № AAL15637.1.

5 Как указано в настоящем описании понятие "DLL3" относится к дельта-подобному каноническому лиганду Notch 3 (DLL3), известному также как как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, который необходим для сегментации сомитов на ранних стадиях развития (Dunwoodie и др., Development 129, 2002, сс.1795-1806). В отличие от лигандов семейства Notch у млекопитающих DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2, которые все активируют передачу 10 сигналов рецептором Notch в транс-направлении (Ntziachristos и др., Cancer Cell 25(3), 2014, сс.318-334), DLL3 локализован главным образом в аппарате Гольджи и не может активировать передачу сигналов Notch (Chapman и др., Hum Mol Genet 20(5), 2011, сс. 905-916 и Geffers и др., J Cell Biol 178(3), 2007, сс. 465-476). Во время нормального развития DLL3 ингибирует активацию как цис-, 15 так и транс-действующего пути Notch путем взаимодействия с Notch и DLL1 (Chapman и др., Hum Mol Genet 20(5), 2011, сс. 905-916). DLL3 в норме либо отсутствует, либо присутствует в очень низких уровнях в здоровых тканях взрослых за исключением головного мозга, но для него характерна 20 сверхэкспрессия в образцах рака легких, рака яичек, глиомы и меланомы (Uhlen и др., Science 357(6352), 2017, eaan2507). Кроме того DLL3 может присутствовать на поверхности опухолевых клеток при мелкоклеточном раке легких (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциноме (LCNEC) (Saunders и др., Sci Transl Med 7(302), 2015, 302ra136 и Sharma и др., Cancer Res 77(14), 2017, сс. 3931-3941), что делает его потенциальной мишенью 25 моноклональных антител при противораковой терапии. Таким образом, моноклональное антитело к DLL3 может найти применение для специфического таргетирования экспрессирующих DLL3 опухолевых клеток и служить в качестве потенциального противоракового терапевтического средства. Понятие "человеческий DLL3" относится к DLL3, имеющему происхождение из 30 организма человека. Пример аминокислотной последовательности человеческого DLL3 представлен в GenBank под регистрационным № NP_058637.1.

Как указано в настоящем описании понятие "CD3" относится к кластеру дифференцировки 3, который представляет собой состоящий из нескольких

субъединиц белковый комплекс, который функционирует в качестве корцептора Т-клеточного рецептора (TCR) (Dong и др., Nature 573(7775), 2019, сс. 546-552). Связывание TCR с комплексом пептид-МНС (pMHC) на поверхности клеток-мишеней индуцирует кластеризацию комплекса TCR-CD3 и активирует внутриклеточную передачу сигналов, опосредуемую ζ -цепью CD3 (Annu Rev Immunol. 27, 2009, сс. 591–619). CD3 требуется для активации Т-клеток и их независимой от pMHC активации терапевтическими средствами, такими как CAR-Т-клетки, и привлекающие Т-клетки активаторы на основе CD3 обладают высокой эффективностью в отношении мобилизации Т-клеток для цитолиза опухолевых клеток (Brown и Mackall, Nat Rev Immunol 19(2), 2019, сс. 73-74 и Clynes и Desjarlais, Annu Rev Med 70, 2019, сс. 437-450). Пример аминокислотной последовательности человеческого CD3 представлен в GenBank под регистрационным № NP_000724.1.

В контексте настоящего описания понятие "опухолеассоциированный антиген (ТАА)" относится к любому пептиду и/или антигену, расположенному на клеточной поверхности, или комбинации пептидов и/или антигенов, расположенных на клеточной поверхности, и их фрагментам, полученным в результате пост-трансляционной модификации (такой как гликозилирование), уровень которых в опухолевых тканях превышает уровень в здоровых тканях. Некоторые опухолеассоциированные антигены, специфически присутствующие в опухолях, известны также как опухолеспецифические антигены (TSA). Примерами опухолеассоциированных антигенов являются вирусные белки, кодируемые онкогенными вирусами; мутантные онкобелки или супрессоры опухолей; характерные для здоровой ткани белки, которые сверхэкспрессируются на и/или в опухолевых клетках; содержащие пост-трансляционные модификации белки клеточной поверхности; онкофетальные белки, экспрессия которых в норме ограничена стадиями развития, но которые отсутствуют в тканях взрослых; и специфические для типа клеток белки, экспрессия которых ограничена не имеющими решающее значение тканями.

В контексте настоящего описания понятие "модулятор иммунных клеток" относится к любой расположенной на клеточной поверхности молекуле, такой как белок, которая экспрессируется на поверхности иммунных клеток и регулирует функцию иммунных клеток. ИСМ включают иммуностимуляторные

молекулы и ингибирующие молекулы. Стимуляторные ИСМ могут опосредовать активацию иммунных клеток, когда специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с определенными характеристиками специфически связывается со стимуляторным ИСМ. Ингибирующий ИСМ подавляет активность иммунной клетки, являющуюся результатом связывания с лигандом/взаимодействующим партнером, что может блокироваться специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с определенными характеристиками, приводящими к активации иммунных клеток. Указанные иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки, НК-клетки, макрофаги или другие типы клеток иммунной системы. Примеры ИСМ включают (но не ограничиваясь только ими) CD3, CD16, CD27, CD28, CD40, CD122, NKp46, OX40, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, SIGLEC7, SIGLEC9, KIR, BTLA и B7-H3.

В контексте настоящего описания понятие "полностью блокирует" или "полная блокада" относится к полному ингибированию связывания антигена-мишени (например, ИСМ такого как CD3) с доменом, связывающим антиген-мишень (например, моноклональное или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент). Полное ингибирование связывания антигена-мишени означает, что отсутствует связывание (например, 0% связывания) антигена-мишени с доменом, связывающим антиген-мишень.

В контексте настоящего описания понятие "частично блокирует" или "частичная блокада" относится к неполному ингибированию связывания антигена-мишени (например, ИСМ, такого, как CD3) с доменом, связывающим антиген-мишень (например, моноклональное или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент). Неполное ингибирование связывания антигена-мишени означает, что имеет место по меньшей мере некоторый уровень связывания (например, от 1% до 99% связывания) антигена-мишени с доменом, связывающим антиген-мишень.

Антитела и биспецифические антитела

Изобретение относится в целом к выделенным биспецифическим антителам, содержащим мутации зарядов на границе СН1 и СL в каждом плече для повышения предпочтительного спаривания когнатных цепей и/или модификации и различения физических свойств самого биспецифического

антитела и примесей с ошибочным спариванием для облегчения очистки с помощью катионообменной хроматографии.

Биспецифические антитела, образованные с помощью двух различных тяжелых цепей (НС) и легких цепей (LC), сложно получать из-за склонности к
5 неправильному спариванию двух тяжелых цепей и двух легких цепей, что приводит к образованию нежелательных продуктов, которые трудно устранять в процессе производства; при этом даже, если нежелательные продукты, образовавшиеся в результате ошибочного спаривания, можно элиминировать в процессе очистки, ошибочное спаривание снижает эффективность производства
10 требуемого продукта в виде биспецифического антитела. Путем объединения стратегии на основе "смещенной межцепочечной дисульфидной связи" в одном плече (PCT/US2020/063066, поданная 3 декабря 2020 г., содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки) с заряженными парами и параллельной интродукции мутаций, приводящих к
15 образованию "выступа" и "впадины", и приводящих к образованию дисульфидных связей с помощью цистеина в Fc-областях, можно с повышенной эффективностью получать гетеродимерное биспецифическое антитело, которое легче очищать с использованием общепринятых методов, таких как ионообменная хроматография и хроматография с гидрофобным
20 взаимодействием. Получение указанных биспецифических антител, включая (но не ограничиваясь только ими) биспецифические антитела анти-CD47/анти-CLDN18.2 и биспецифические антитела анти-CD3/анти-DLL3, можно осуществлять путем совместной экспрессии двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

25 Изобретение относится в целом к выделенным биспецифическим антителам, содержащим заряженные пары или комбинацию заряженных пар, или комбинацию заряженных пар со смещенной межцепочечной дисульфидной связью в одном плече, во втором плече которых сохраняется нативная межцепочечная дисульфидная связь. В частности, изобретение относится в
30 целом к биспецифическим антителам против двух антигенов, которые экспрессируются на одной и той же раковой клетке, двух антигенов, из которых один экспрессируется на раковой клетке, а второй присутствует в качестве растворимого лиганда, или двух антигенов, из которых один экспрессируется на

раковой клетке, а второй на другой клетке, такой как иммунная клетка; нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим биспецифические антитела; рекомбинантным клеткам, содержащим векторы; и композициям, содержащим биспецифические антитела. Предложены также

5 способы создания биспецифических антител и способы применения биспецифических антител для лечения заболеваний, включая рак. Биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, обладают одним или несколькими требуемыми функциональными свойствами, включая (но не ограничиваясь только ими) высокую аффинность связывания с обоими

10 антигенами, высокую специфичность в отношении обоих антигенов, способность индуцировать опосредованный эффекторами лизис опухолевых клеток, способность стимулировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток,

15 экспрессирующих один или два антигена, способность опосредовать рекрутинг конъюгированных лекарственных средств и способность ингибировать рост опухолей у субъектов и на животных моделях при введении индивидуально или в комбинации с другими противораковыми терапиями. Биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, могут представлять собой антитела, у

20 которых оба плеча связываются с двумя различными антигенами на одной и той же клетке и опосредуют несколько биологических действий. Мишенью одного из двух плечей может являться CD47, который можно блокировать для индукции опосредуемого макрофагами фагоцитоза. Биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, могут также являться активаторами иммунных

25 клеток, например, привлекающих Т-клетки активаторами, одно плечо которых связывается с антигеном на раковых клетках, а другое плечо связывается с Т-клетками, опосредуя зависящий от Т-клеток цитолиз раковых клеток. Аминокислоты с противоположными зарядами, интродуцированные в CH1- и CL-области каждого плеча биспецифического антитела, могут усиливать

30 правильное когнатное спаривание каждой тяжелой цепи с соответствующей ей легкой цепью (H1L1 и H2L2). Противоположно заряженная(ые) пара(ы) позволяет(ют) лучше различать физические свойства биспецифического антитела и потенциальных примесей, экспрессируемых клетками в процессе

производства, облегчая очистку и производство требуемого биспецифического антитела.

В настоящем описании понятие "антитело" используют в широком смысле, оно включает молекулу иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. В целом, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые обладают способностью специфически связываться с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно разделяют на подклассы, такие как изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Таким образом, антитела, предлагаемые в изобретении, могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующим подклассам. Предпочтительно антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных животных можно относить на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко различимых типов, а именно, каппа и лямбда. Таким образом, антитела, предлагаемые в изобретении, могут содержать константный домен легкой каппа- или лямбда цепи. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, включают константные области тяжелой и/или легкой цепи(ей) из крысиных или человеческих антител. Помимо константных доменов тяжелых и легких цепей антитела содержат антигенсвязывающий участок, который состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждый из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность участки 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Альтернативно этому, домены варибельной области легкой цепи обозначают как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и альтернативно этому, домены варибельной области тяжелой цепи обозначают как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Для нумерации аминокислотных остатков в антителах применяют несколько систем. Метод нумерации по Кэботу представляет собой схему, основанную на варибельных участках антител (Elvin A. Kabat и др., Sequences

of Proteins of Immunological Interest 5-ое изд., 1991). Систему EU-нумерации широко применяют для константных доменов (включая участки СН1, шарнира и Fc) (Elvin A. Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5-ое изд., 1991).

5 В контексте настоящего описания понятие "выделенное антитело" относится к антителу, практически свободному от других антител, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с DLL3, практически свободно от антител, которые не связываются с DLL3, выделенное антитело, которое специфически
10 связывается с CD3, практически свободно от антител, которые не связываются с CD3, биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD3 и DLL3, практически свободно от антител, которые не связываются с CD3 и DLL3). Кроме того, выделенное антитело практически свободно от других клеточных материалов и/или химических веществ.

15 В контексте настоящего описания понятие "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в естественных условиях мутаций, которые присутствуют в минорных количествах.

20 Моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать с помощью метода гибридом, технологии фагового дисплея, технологии клонирования гена единичного лимфоцита или методов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме
25 человека, такого как трансгенная мышь или крыса, которое имеет геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому, например, как диабоди (димерное антитело), Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидом Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидом диабоди (ds-диабоди), молекула
30 одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер

(двухвалентное диабоди), мультиспецифическое антитело, состоящее из участка антитела, содержащего один или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, нанободи, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело или фрагмент родительского антитела. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. Согласно другим конкретным вариантам осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В контексте настоящего описания понятие "одноцепочечное антитело" относится к каноническому для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом, содержащим от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. В контексте настоящего описания понятие "однодоменное антитело" относится к каноническому для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

В контексте настоящего описания понятие "человеческое антитело" относится к антителу, которое образуется в организме человека, или антителу, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, которое образуется в организме человека, созданную с использованием любой технологии, известной в данной области. Под указанное определение человеческого антитела подпадают интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, которые содержат по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В контексте настоящего описания понятие "гуманизированное антитело" относится к нечеловеческому антителу, модифицированному для повышения гомологии последовательности с человеческим антителом, в результате чего

сохраняются антигенсвязывающие свойства антитела, но снижается антигенность в организме человека.

В контексте настоящего описания понятие "химерное антитело" относится к антителу, в котором аминокислотную последовательность молекулы иммуноглобулина получают из двух или большего количества видов. 5
Вариабельная область и легкой, и тяжелой цепи часто соответствует вариабельной области антитела из одного из видов млекопитающих (например, мышь, крыса, кролик и т.д.), которая обладает требуемой специфичностью, аффинностью и потенциалом, в то время как константные области 10
соответствуют последовательностям антитела из другого вида млекопитающих (например, человека), для того, чтобы избежать возникновения иммунного ответа у этого вида.

В контексте настоящего описания понятие "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, которое содержит несколько 15
последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, в котором первая из нескольких последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина обладает связывающей специфичностью в отношении первого эпитопа, а вторая из нескольких последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина 20
обладает связывающей специфичностью в отношении второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления изобретения 25
первый и второй эпитопы перекрываются или в значительной степени перекрываются. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы не перекрываются или в значительной степени не 30
перекрываются. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

В контексте настоящего описания понятие "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, которое связывается не более чем с двумя эпитопами или двумя антигенами. Для биспецифического антитела характерно наличие первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет связывающую специфичность в отношении первого эпитопа, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая имеет связывающую специфичность в отношении второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы перекрываются или в значительной степени перекрываются. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют связывающую специфичность в отношении первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые имеют связывающую специфичность в отношении второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, которое/который имеет связывающую специфичность в отношении первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, которое/который имеет связывающую специфичность в отношении второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, который имеет связывающую специфичность в отношении первого эпитопа, и scFv, или его фрагмент, который имеет связывающую специфичность в отношении второго эпитопа.

В контексте настоящего описания понятие "заряженная пара" относится к паре аминокислот, в которой одна имеет положительный заряд, а другая имеет отрицательный заряд, которые можно интродуцировать путем замены нативных аминокислотных остатков в CH1-участке тяжелой цепи и CL-участке легкой

цепи первого плеча биспецифического антитела соответственно, и одновременно такую же пару положительно заряженной и отрицательно заряженной аминокислот можно интродуцировать путем замены нативных аминокислотных остатков в CL-участке легкой цепи и CH1-участке тяжелой цепи второго плеча биспецифического антитела соответственно. Альтернативно этому, положительно заряженную и отрицательно заряженную аминокислоты можно интродуцировать путем аминокислотной замены в VH-область тяжелой цепи и VL-область легкой цепи первого плеча биспецифического антитела соответственно, и одновременно такую же пару положительно заряженной и отрицательно заряженной аминокислот можно интродуцировать путем аминокислотной замены в VL-область легкой цепи и VH-область тяжелой цепи второго плеча соответственно. Аминокислоты, применяемые для создания заряженных пар, как правило, включают D/E (отрицательный заряд) и K/R (положительный заряд). После интродукции в CH1/CL-участки или VH/VL-области заряженная пара аминокислот структурно находится в непосредственной близости и, как ожидается, усиливает взаимодействие тяжелой цепи с легкой цепью в одном и том же плече за счет противоположных зарядов и устраняет ошибочное взаимодействие тяжелой цепи с легкой цепью (ошибочно спаренные тяжелая цепь и легкая цепь находятся на двух разных плечах) посредством одних и тех же зарядов. Полученное в результате распределение зарядов интродуцированной заряженной пары является следующим: H1 (CH1, положительный заряд)/L1 (CL, отрицательный заряд)/H2 (CH1, отрицательный заряд)/L2 (CL, положительный заряд) или H1 (CH1, отрицательный заряд)/L1 (CL, положительный заряд)/H2 (CH1, положительный заряд)/L2 (CL, отрицательный заряд). Множество заряженных пар можно объединять и интродуцировать на границу раздела CH1 и CL, при этом все положительно заряженные аминокислоты интродуцируют в CH1, а все отрицательно заряженные аминокислоты интродуцируют в CL одного и того же плеча или наоборот, для того, чтобы соответствовать приведенной выше схеме распределения. Такой же подход можно применять к границе раздела VH/VL. Кроме того, одну или несколько заряженных пар можно интродуцировать также на границу раздела VH и VL в сочетании с одной или несколькими заряженными парами, интродуцированными на границу раздела CH1/CL –аминокислоты,

интродуцированные в одну и ту же цепь (либо H1, L1, H2, либо L2), как правило, имеют одинаковый заряд, и полученное в результате распределение зарядов интродуцированной заряженной пары является следующим: H1 (CH1 и VH, положительный заряд)/L1 (CL и VL, отрицательный заряд)/H2 (CH1 и VH, отрицательный заряд)/L2 (CL и VL, положительный заряд) или H1 (CH1 и VH, отрицательный заряд)/L1 (CL и VL, положительный заряд)/H2 (CH1 и VH, положительный заряд)/L2 (CL и VL отрицательный заряд). Замены, приводящие к образованию заряженных пар, можно объединять также с другими модификациями для дополнительно усиления предпочтительного спаривания когнатных цепей (H1L1 и H2L2 соответственно) и/или облегчения очистки биспецифического антитела с помощью ионообменной хроматографии и/или НИС. Например, в дополнение к заменам, приводящим к образованию заряженных пар, нативную межцепочечную дисульфидную связь на одном плече биспецифического антитела можно смещать, в то время как в другом плече присутствует нативная межцепочечная дисульфидная связь (см., например, WO 2021/126538, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки).

В описанных заряженных парах G166D/E обозначает замену G в положении 166 (EU-нумерация) на D или E, в этом случае G166 представляет сайт нокина (knock-in); D170D/E обозначает сохранение D в положении 170 или замену D в положении 170 на E; все другие замены подчиняются такому же правилу обозначений.

В контексте настоящего описания понятие антитело, которое "специфически связывается с CD3, DLL3 и их комбинациями" или антитело, которое "специфически связывается с CD47, CLDN18.2 и их комбинациями" относится к антителу, которое связывается с CD3, DLL3 и их комбинациями, или к антителу, связывание которого с CD47, CLDN18.2 и их комбинациями, предпочтительно с человеческим CD3, человеческим DLL3, человеческим CD47, человеческим CLDN18.2 и их комбинациями, характеризуется величиной KD, составляющей 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Понятие "KD" относится к константе диссоциации, которую определяют из соотношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде

молярной концентрации (М). Величины КD для антител можно определять с помощью методов, известных в данной области, с учетом настоящего описания. Например, КD антитела можно определять с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием биосенсорной системы, такой, например, как система Biacore®, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система Octet RED96.

Чем ниже величина КD антитела, тем с большей аффинностью антитело связывается с антигеном-мишенью.

В контексте настоящего описания понятие "специфическое связывание" относится к более значительному связыванию антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по сравнению с контрольным антигеном, и/или более значительному связыванию антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по сравнению с контрольным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, где контрольный антиген отличается от антигена-мишени при сравнении последовательности и/или структуры, а контрольное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент значительно и селективно связывается только с соответствующим ему антигеном, который отличается от антигена-мишени при сравнении последовательности и/или структуры.

В контексте настоящего описания понятие "EC₅₀" относится к половине максимальной эффективной концентрации моноклонального или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предлагаемого в изобретении. EC₅₀ означает концентрацию моноклонального или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, необходимую для индукции биологического ответа (т.е. гибели клетки), составляющую половину между базовым значением и максимумом в течение заданного времени экспозиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют величину EC₅₀, составляющую менее чем примерно 1мкМ, от примерно 1000нМ до примерно 100нМ, от примерно 100нМ до примерно 10нМ, от примерно 10нМ до примерно 1нМ, от примерно 1000пМ до примерно 500пМ, от примерно 500пМ до примерно 200пМ, менее чем примерно 200пМ, от примерно 200пМ до

примерно 150пМ, от примерно 200пМ до примерно 100пМ, от примерно 100пМ до примерно 10пМ или от примерно 10пМ до примерно 1пМ.

Согласно другому конкретному объекту изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим

5 фрагментам, которые содержат:

а. первую тяжелую цепь, H1;

б. вторую тяжелую цепь, H2;

в. первую легкую цепь, L1; и

г. вторую легкую цепь, L2;

10 в которых H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с первым антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, и в которых H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается со вторым антигеном, предпочтительно вторым антигеном человеческого происхождения, в
15 которых

(а) H1 и H2 каждая содержит CH1-участок человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; и

20 (б) L1 и L2 каждая содержит CL-участок человеческой легкой каппа-цепи или человеческой легкой лямбда-цепи;

в которых H1L1 и H2L2 каждая содержит заряженную пару, выбранную из группы, которая состоит из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1-участке H1 и S114K/R CL-участке L1 соответственно и G166K/R в CH1-участке H2 и S114D/E в CL-участке L2 соответственно;

25 (2) T187D/E в CH1-участке H1 и D/N170K/R в CL-участке L1 соответственно и T187K/R в CH1-участке H2 и D/N170D/E в CL-участке L2 соответственно;

(3) S131D/E в CH1-участке H1 и P119K/R в CL-участке L1 соответственно и S131K/R в CH1-участке H2 и P119D/E в CL-участке L2 соответственно;

30 (4) A129D/E в CH1-участке H1 и S121K/R в CL-участке L1 соответственно и A129K/R в CH1-участке H2 и S121D/E в CL-участке L2 соответственно;

(5) G166D/E в CH1-участке H2 и S114K/R в CL-участке L2 соответственно и G166K/R в CH1-участке H1 и S114D/E в CL-участке L1 соответственно;

(6) T187D/E в СН1-участке Н2 и D/N170K/R в CL-участке L2 соответственно и T187K/R в СН1-участке Н1 и D/N170D/E в CL-участке L1 соответственно;

5 (7) S131D/E в СН1-участке Н2 и P119K/R в CL-участке L2 соответственно и S131K/R в СН1-участке Н1 и P119D/E в CL-участке L1 соответственно; или

(8) A129D/E в СН1-участке Н2 и S121K/R в CL-участке L2 соответственно и A129K/R в СН1-участке Н1 и S121D/E в CL-участке L1 соответственно.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из двух тяжелых цепей Н1 и Н2 содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых VH-области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из двух тяжелых цепей Н1 и Н2 содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых Fc-области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL-область и CL-участок, в которых VL-области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL-область и CL-участок, в которых CL-участки имеют разные аминокислотные последовательности.

20 В другом конкретном объекте изобретения Н1 и Н2 образуют гетеродимер.

В другом конкретном объекте изобретения (а) отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) интродуцируют в G166, T187, S131 или A129 в СН1 Н1 (при этом положительно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL L1, как описано выше) и положительно заряженную аминокислоту (K или R) интродуцируют в соответствующий остаток СН1 Н2 (при этом положительно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL L2, как описано выше), VH-область Н1 и VL-область L1 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K соответственно, а VH -область Н2 и VL-область L2 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E соответственно; или (б) положительно заряженную аминокислоту (K или R) интродуцируют в G166, T187, S131 или A129 в СН1 Н1 (при этом отрицательно заряженную аминокислоту интродуцируют в

соответствующее положение в CL L1, как описано выше) и отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) интродуцируют в соответствующий остаток в CH1 H2 (при этом положительно заряженную аминокислоту интродуцируют в соответствующее положение в CL L2, как описано выше), VH-область H1 и VL-область L1 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E соответственно, а VH-область H2 и VL-область L2 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K соответственно.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CH1- и CL-участки одного из двух плечей, содержащие аминокислотные замены на аминокислотном остатке, соответствующем аминокислотному положению в SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20 для CH1 и в SEQ ID NO: 21 или 22 для CL, где аминокислотные замены в CH1- и CL-участках выбирают из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
 - (2) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
 - (3) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или
 - (4) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;
- где X выбирают из S, A или G.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, и плечо, содержащее антитело к ТАА или его антигенсвязывающий фрагмент, где CD47 и ТАА экспрессируются на одной и той же клетке, и обладает способностью специфически связываться и с CD47, и с ТАА, предпочтительно человеческими CD47 и ТАА. Выделенное антитело к CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать, например, VH, CH1, VL и CL, которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CLDN18.2, предпочтительно человеческим CLDN18.2.

В другом конкретном объекте изобретения анти-CD47 антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 29 соответственно;
- 5 (2) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 29 соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 30 соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 30 соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 33 соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 33 соответственно;
- 10 (7) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 34 соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 34 соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 37 соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 37 соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 38 соответственно;
- 15 (12) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 38 соответственно;
- (13) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 41 соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 41 соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 42 соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 42 соответственно;
- 20 (17) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 45 соответственно;
- (18) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 45 соответственно;
- (19) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 46 соответственно;
- (20) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 46 соответственно;
- (21) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 49 соответственно;
- 25 (22) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 49 соответственно;
- (23) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 50 соответственно;
- (24) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 50 соответственно;
- (25) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 53 соответственно;
- (26) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 53 соответственно;
- 30 (27) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 54 соответственно;
- (28) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 54 соответственно;
- (29) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 57 соответственно;
- (30) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 57 соответственно;

- (31) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 58 соответственно;
- (32) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 58 соответственно;
- (33) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 29 соответственно;
- (34) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно;
- 5 (35) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 30 соответственно;
- (36) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 30 соответственно;
- (37) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 33 соответственно;
- (38) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 33 соответственно;
- (39) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 34 соответственно;
- 10 (40) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 34 соответственно;
- (41) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 37 соответственно;
- (42) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 37 соответственно;
- (43) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 38 соответственно;
- (44) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 38 соответственно;
- 15 (45) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 41 соответственно;
- (46) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 41 соответственно;
- (47) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 42 соответственно;
- (48) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 42 соответственно;
- (49) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 45 соответственно;
- 20 (50) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 45 соответственно;
- (51) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 46 соответственно;
- (52) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 46 соответственно;
- (53) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 49 соответственно;
- (54) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 49 соответственно;
- 25 (55) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 50 соответственно;
- (56) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 50 соответственно;
- (57) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 53 соответственно;
- (58) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 53 соответственно;
- (59) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 54 соответственно;
- 30 (60) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 54 соответственно;
- (61) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 57 соответственно;
- (62) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 57 соответственно;
- (63) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 58 соответственно; или

(64) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 58 соответственно.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело анти-CD47/анти-CLDN18.2, в котором первый
5 антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 1, 28, 2, 29, 3, 63, 4 и 64 соответственно;

(2) SEQ ID NO: 1, 36, 2, 37, 3, 67, 4 и 68 соответственно;

10 (3) SEQ ID NO: 1, 44, 2, 45, 3, 71, 4 и 72 соответственно;

(4) SEQ ID NO: 1, 52, 2, 53, 3, 73, 4 и 74 соответственно;

(5) SEQ ID NO: 1, 31, 2, 34, 3, 65, 4 и 66 соответственно;

(6) SEQ ID NO: 1, 39, 2, 42, 3, 69, 4 и 70 соответственно;

(7) SEQ ID NO: 1, 47, 2, 50, 3, 75, 4 и 76 соответственно;

15 (8) SEQ ID NO: 1, 55, 2, 58, 3, 77, 4 и 78 соответственно;

(9) SEQ ID NO: 23, 28, 24, 29, 59, 63, 60 и 64 соответственно;

(10) SEQ ID NO: 23, 36, 24, 37, 59, 67, 60 и 68 соответственно;

(11) SEQ ID NO: 23, 44, 24, 45, 59, 71, 60 и 72 соответственно;

(12) SEQ ID NO: 23, 52, 24, 53, 59, 73, 60 и 74 соответственно;

20 (13) SEQ ID NO: 25, 31, 26, 34, 61, 65, 62 и 66 соответственно;

(14) SEQ ID NO: 25, 39, 26, 42, 61, 69, 62 и 70 соответственно;

(15) SEQ ID NO: 25, 47, 26, 50, 61, 75, 62 и 76 соответственно; или

(16) SEQ ID NO: 25, 55, 26, 58, 61, 77, 62 и 78 соответственно.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое
25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к модулятору иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент, и обладает способностью специфически связываться с ICM, предпочтительно человеческим ICM. ICM можно выбирать, например, из группы, которая состоит из CD3, CD16, CD27, CD28, CD40, CD122, NKp46,
30 OX40, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, SIGLEC7, SIGLEC9, KIR, BTLA, B7-H3 и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

В другом конкретном объекте изобретения антитело к ICM или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и обладает способностью специфически связываться с CD3, предпочтительно человеческим CD3. Выделенное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно.

В другом конкретном объекте изобретения выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью привлекать Т-клетки к экспрессирующим DLL3 раковым клеткам и активировать опосредуемый Т-клетками цитолиз раковых клеток. В другом конкретном объекте изобретения первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно, а второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16 соответственно.

Полноразмерные биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, можно создавать, например, используя обмен Fab-плечей (или обмен полумолекул) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами путем интродукции замен на границу раздела CH3 тяжелой цепи в каждой полумолекуле, способствуя образованию гетеродимера двух полумолекул антител, которые обладают различной специфичностью, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечей является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях родительских моноспецифических антител восстанавливаются. Образовавшиеся свободные цистеины одного из родительских моноспецифических антител образуют дисульфидную связь между тяжелыми цепями с остатками цистеина второй родительской молекулы моноспецифического антитела, и одновременно CH3-домены родительских

антител высвобождаются и преобразовываются путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плечей можно конструировать таким образом, чтобы гетеродимеризация преобладала над гомодимеризацией. Образовавшийся продукт представляет собой биспецифическое антитело, которое имеет два Fab-плеча или две полумолекулы, каждое/каждая из которых связывается с отличающимся от других эпитопом, т.е. эпитопом на CD3, эпитопом на DLL3 и их комбинациями или эпитопом на CD47, эпитопом на CLDN18.2 и их комбинациями.

В контексте настоящего описания понятие "гомодимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В контексте настоящего описания понятие "гомодимер" относится к антителу, которое имеет две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В контексте настоящего описания понятие "гетеродимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих не идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В контексте настоящего описания понятие "гетеродимер" относится к антителу, которое имеет две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию "knob-in-hole" ("выступ-во-впадину") (см. публикацию, PCT WO 2006/028936). В целом, метод состоит в следующем: отобранные аминокислоты, образующие границу раздела СНЗ-доменов в человеческом IgG, можно подвергать мутациям в положениях, влияющих на взаимодействия СНЗ-доменов, для того, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с небольшой боковой цепью ("впадина") интродуцируют в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, и аминокислоту с крупной боковой цепью ("выступ") интродуцируют в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител образуется гетеродимер в результате преимущественного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" с тяжелой цепью с "выступом". Примером пар замен в СНЗ, образующих "выступ" и "впадину" (представленных в виде модифицированных положений в первом СНЗ-домене первой тяжелой цепи/модифицированного положения во втором

СНЗ-домене второй тяжелой цепи), являются: T366Y/F405A, T366W/ F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

5 Можно применять другие стратегии, такие как стратегии, способствующие гетеродимеризации тяжелых цепей, основанные на использовании электростатических взаимодействий, путем замены положительно заряженных остатков на границе раздела одного СНЗ и отрицательно заряженных остатков на границе раздела второго СНЗ, например, описанные в публикации патента США № 2010/0015133; публикации патента США № 2009/0182127; публикации патента США № 2010/028637; или публикации патента США № 2011/0123532. При применении других стратегий гетеродимеризацию можно активизировать с помощью следующих замен (представленных в виде модифицированного положения в первом СНЗ-домене первой тяжелой цепи/модифицированного положения во втором СНЗ-домене второй тяжелой цепи):

10 L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, or T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, например, описанных в публикации патента США № 2012/0149876 или публикации патента США № 2013/0195849.

20 В дополнение к методам, описанным выше, биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде путем интродукции асимметричных мутаций в СНЗ-участки двух моноспецифических гомодимерных антител и получения биспецифического гетеродимерного антитела из двух родительских моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях, обеспечивающих изомеризацию дисульфидных связей, согласно методам, описанным в публикации РСТ WO 2011/131746. При осуществлении указанных методов создают первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело, которые имеют определенные замены в СНЗ-домене, которые способствуют стабилизации гетеродимера; антитела инкубируют совместно в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволять цистеинам в шарнирной области подвергаться изомеризации дисульфидной связи; создавая тем самым биспецифическое

25

30

антитело путем обмена Fab-плечей. Условия инкубации при необходимости можно возвращать к невозстановливающим условиям. Примерами восстановителей, которые можно применять, являются 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиозэритритол (ДТЕ), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительным является восстановитель, выбранный из группы, которая состоит из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно применять инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5мМ дитиотреитола при рН от 5 до 8, например, при рН 7,0 или при рН 7,4.

Полноразмерные биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, можно создавать, используя комбинацию описанных выше подходов, основанных на гетеродимеризации, и нескольких указанных ниже подходов: (а) смещение межцепочечной дисульфидной связи HC/LC на одном плече биспецифического антитела (см., например, WO 2021/126538, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в виде ссылки); (б) интродукция заряженных пар на границу раздела VH/VL; (в) интродукция заряженных пар на границу раздела CH1/CL; или (г) комбинация некоторых или всех подходов, указанных в подпунктах (а)-(в).

Другим основным объектом изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что кодирующую последовательность белка можно заменять (например, заменять, удалять, встраивать и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Таким образом, специалистам в данной области должно быть очевидно, что нуклеотидные последовательности, кодирующие биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, предлагаемые в изобретении, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

Другим основным объектом изобретения является вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в

изобретении. Можно применять любой вектор, известный специалистам в данной области в свете настоящего описания, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент, необходимый для обеспечения общепринятой функции экспрессионного вектора, например, промотор, рибосомосвязывающий элемент, терминатор, энхансер, маркер для селекции и сайт инициации репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцибельный или репрессируемый промотор. Ряд экспрессионных векторов, которые обладают способностью доставлять нуклеиновые кислоты в клетки, известны в данной области и согласно настоящему описанию их можно применять для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Для создания рекомбинантного экспрессионного вектора, указанного в вариантах осуществления изобретения, можно использовать общепринятые технологии клонирования или синтеза искусственных генов. Такие технологии хорошо известны специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение.

Другим основным объектом изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор, который содержит выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении. Любую клетку-хозяина, известную специалистам в данной области в свете настоящего описания, можно применять для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предлагаемых в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv- или Fab-фрагмента антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG-типа).

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения рекомбинантным экспрессионным вектором трансформируют клетки-хозяева, используя общепринятые методы, такие как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, при применении которых происходит стабильная

интеграция в геном клетки-хозяина, приводящая к эффективной экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Другим основным объектом изобретения является способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предлагаемого в изобретении, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающие получение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предлагаемого в изобретении, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессируемые биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать с помощью общепринятых методов, известных в данной области и представленных в настоящем описании.

15 Фармацевтические композиции

Другим основным объектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего описания понятие "фармацевтическая композиция" означает продукт, который содержит антитело, предлагаемое в изобретении, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела, предлагаемые в изобретении, и содержащие их композиции можно применять также для приготовления лекарственного средства, предназначенного для указанных в настоящем описании терапевтических применений.

В контексте настоящего описания понятие "носитель" относится к любому из следующих ингредиентов: эксципиент, разбавитель, наполнитель, соль, буфер, стабилизатор, солюбилизатор, масло, липид, содержащая липид везикула, микросфера, липосомальная капсула или другой материал, хорошо известный в области применени фармацевтических препаративных форм. Хорошо известно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя должны зависеть от пути введения при конкретном применении. В контексте настоящего описания понятие "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному

материалу, который не влияет на эффективность композиции, предлагаемой в изобретении, или на биологическую активность композиции, предлагаемой в изобретении. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения в свете настоящего описания в изобретении можно применять любой

5 фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела.

Формы фармацевтических действующих веществ с фармацевтически приемлемыми носителями известны в данной области (см., например,, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-ое изд., 2005 г. и 10 любые следующие издания). Примеры дополнительных ингредиентов включают (но не ограничиваясь только ими) буферы, разбавители, растворители, регулирующие точность агенты, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. В составе фармацевтических композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять один или несколько фармацевтически 15 приемлемых носителей.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкую препаративную форму. Предпочтительным примером жидкой препаративной формы является водная препаративная форма, т.е. препаративная форма содержащая воду. Жидкая 20 препаративная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водная препаративная форма, как правило, содержит по меньшей мере 50 мас.% или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95 мас.% воды.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию можно приготавливать в виде инъекционной формы, которую 25 можно инъектировать, например, с помощью предназначенного для инъекции устройства (например, шприц или инфузионный насос). Инъекцию можно осуществлять, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в стекловидное тело или внутривенно.

30 В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой твердую препаративную форму, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать непосредственно или в которую медицинский работник или

пациент добавляют растворители и/или разбавители перед применением. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки, покрытые оболочкой, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может иметь также форму, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или предназначенных для восстановления порошков.

5
10
Лекарственные формы могут представлять собой формы с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут представлять собой формы с замедленным высвобождением, пролонгированным высвобождением или модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

15
В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию можно доставлять через нос, внутрь ротовой полости или подъязычно.

20
Значение pH водной препаративной формы может составлять от pH 3 до pH 10. В одном из вариантов осуществления изобретения pH препаративной формы составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH препаративной формы составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

25
30
В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Примеры буферов включают (но не ограничиваясь только ими): аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, вторичный кислый фосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, первичный кислый фосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных буферов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Примеры консервантов включают (но не ограничиваясь только ими): бензетонийхлорид, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксибензоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, *o*-крезол, *m*-крезол, *n*-крезол, этил-4-гидроксибензоат, имидомочевину, метил-4-гидроксибензоат, фенол, 2-феноксиэтанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксибензоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных консервантов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонирующий агент. Примеры изотонирующих агентов включают (но не ограничиваясь только ими): соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиолпропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, ПЭГ400) и их смеси. Другим примером изотонирующего агента является сахар. В качестве примеров сахаров можно рассматривать (но не ограничиваясь только ими) моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-НПСД, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы. Другим примером изотонирующего агента является сахарный спирт, где понятие "сахарный спирт" относится к С₍₄₋₈₎углеводу, имеющему по меньшей мере одну -ОН-группу. Примеры сахарных спиртов включают (но не ограничиваясь только ими): маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабитол. Фармацевтические композиции, содержащие любой из изотонирующих агентов, перечисленных в данном параграфе, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

Изотонирующий агент может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных изотонирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Примеры хелатирующих агентов включают (но не ограничиваясь только ими): лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Примеры стабилизаторов включают (но не ограничиваясь только ими) один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-гидроксицеллюлозу и их производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как ПЭГ 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие вещества (такие как монотиоглицерин) или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных
5 вещества. Понятие "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимого (гидрофильного) фрагмента и жирорастворимого (липофильного) фрагмента. Поверхностно-активное вещество может представлять собой, например, вещество, выбранное из группы, которая состоит из анионных поверхностно-активных веществ,
10 катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любое из указанных
15 конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, таких, например, как EDTA и/или бензамидина гидрохлорид (HCl). Ингибитор
20 протеазы может присутствовать индивидуально или в совокупности с другими ингредиентами в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие любой из указанных конкретных ингибиторов протеаз, представляют собой альтернативные варианты
25 осуществления изобретения.

Другим основным объектом изобретения является способ получения фармацевтической композиции, которая содержит биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в
30 изобретении, включающий объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Способы применения

Основным объектом изобретения является способ таргетирования CD47 и ТАА (такого как CLDN18.2), которые оба экспрессируются на поверхности

раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, посредством активации опосредуемого макрофагами фагоцитоза раковой клетки, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, биспецифического антитела анти-ТАА/анти-CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

5
10 Основным объектом изобретения является способ таргетирования DLL3, который экспрессируется на поверхности раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, посредством привлечения Т-клеток; способ включает введение субъекту, который нуждается в этом, биспецифического антитела анти-ТАА/анти-DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении.

15
20
25
30 Функциональную активность моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с антигеном-мишенью (например, ICM, таким как CD3), или биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются и с ТАА (например, DLL3), и с Т-клеточным антигеном-мишенью (например, ICM, таким как CD3), или связываются и с ТАА, и с CD47 на одной и той же клетке, можно характеризовать с помощью методов, известных в данной области и указанных в настоящем описании. Методы, предназначенные для характеристики биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются и с ТАА (например, DLL3), и с Т-клеточным антигеном (например, CD3), включают (но не ограничиваясь только ими) основанный на привлечении клеток анализ перекрестного сшивания или анализ Т-клеточной активации, и анализы аффинности и специфичности, которые включают анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA, FACS и OctetRed. Методы, предназначенные для характеристики биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются и с ТАА (например, CLDN18.2), и с CD47 на одной и той же клетке, включают (но не ограничиваясь только ими) анализы Biacore, ELISA, FACS и OctetRed. Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения методы, предназначенные для характеристики биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются и с DLL3, и с CD3, включают описанные ниже методы. Функциональную активность моноклональных антител или их

антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с ICM, или биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются и с ТАА (например, DLL3), и с ICM, отличным от CD3, можно характеризовать с помощью методов, аналогичных описанным выше.

5 Другим основным объектом изобретения является способ таргетирования одного или нескольких антигенов, которые экспрессируются на поверхности раковой клетки, у субъекта, которых нуждается в этом, включающий применение опосредуемой CD3 активации Т-клеток, и/или лечения рака у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту
10 фармацевтической композиции, которая содержит выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. Необязательно рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, гепатоцеллюлярной карциномы,
15 почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического
20 миелолейкоза (CLL), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Другим основным объектом изобретения является способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту,
25 кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, пригодных для получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Другим основным объектом изобретения является способ получения
30 фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Другим основным объектом изобретения является способ лечения рака у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, выделенного биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как биспецифическое антитело анти-CD47/анти-CLDN18.2 или биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3, или фармацевтической композиции, предлагаемой в изобретении. Рак может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, его можно выбирать из (но не ограничиваясь только ими) рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелолейкоза (CMML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Согласно вариантам осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит в терапевтически эффективном количестве биспецифическое антитело анти-D47/анти-CLDN18.2 или анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в изобретении. В контексте настоящего описания понятие "терапевтически эффективное количество" относится к количеству действующего вещества или компонента, которое вызывает желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом в соответствии с поставленной целью.

В контексте настоящего описания касательно биспецифических антител анти-D47/анти-CLDN18.2 или анти-CD3/анти-DLL3 или их антигенсвязывающих фрагментов терапевтически эффективное количество означает количество биспецифического антитела анти-D47/анти-CLDN18.2 или анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, который нуждается в этом. Кроме того, в контексте настоящего описания касательно биспецифических антител анти-CD47/анти-CLDN18.2 или

анти-CD3/анти-DLL3 или их антигенсвязывающих фрагментов терапевтически эффективное количество означает количество биспецифического антитела анти-CD47/анти-CLDN18.2 или анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, результатом применения которого является лечение заболевания, нарушения или состояния; предупреждение или замедление прогрессирования заболевания, нарушения или состояния; или снижение или полное ослабление симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелолейкоза (CMML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей. Согласно другим конкретным вариантам осуществления изобретения подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние представляет собой воспалительное заболевание, метаболическое заболевание или любое другое заболевание, при котором биспецифическое антитело можно применять в качестве терапии.

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения понятие "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапии, достаточному для достижения одного, двух, трех, четырех или большего количества следующих результатов: (I) уменьшение или смягчение тяжести подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; (II) снижение продолжительности подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; (III) предупреждение прогрессирования подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; (IV) вызывание регресса подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или

связанного с ними симптома; (V) предупреждение развития или возникновения подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; (VI) предупреждение повторения подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; (VII) сокращение количества госпитализаций субъекта, имеющего подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние или связанный с ними симптом; (VIII) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние или связанный с ними симптом; (IX) увеличение выживаемости субъекта, имеющего подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние или связанный с ними симптом; (X) ингибирование или уменьшение подлежащего лечению заболевания, нарушения или состояния или связанного с ними симптома; и/или (XI) усиление или улучшение профилактического или терапевтического действия(й) другой терапии.

15 Терапевтически эффективное количество или терапевтически эффективная доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как подлежащее лечению заболевание, нарушение или состояние, пути введения, область-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, вес тела, состояние здоровья), представляет собой субъект человека или животное, другие применяемые медицинские средства и от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Оптимально, когда применяемые для лечения дозы подбираются для обеспечения максимальной безопасности и эффективности.

25 Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения композиции, указанные в настоящем описании, приготавливаются таким образом, чтобы они соответствовали предполагаемому пути введения субъекту. Например, композиции, указанные в настоящем описании, можно приготавливать таким образом, чтобы их можно было применять для внутривенного, подкожного или внутривенного введения.

30 В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" все относятся к улучшению или реверсии по меньшей мере одного поддающего измерению физического параметра, связанного с раком, который не обязательно обнаружен у субъекта, но может

быть обнаружен у субъекта. Понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" могут относиться также к обеспечению регресса, предотвращению прогрессирувания или по меньшей мере замедлению прогрессирувания заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления изобретения понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" относятся к 5 улучшению, предупреждению развития или возникновения или сокращению продолжительности одного или несколько симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления изобретения понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" относятся к предупреждению рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления изобретения понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, 10 нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления изобретения понятия "лечить", "процесс лечения и "лечение" относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

Конкретными вариантами осуществления изобретения является композиция, применяемая для лечения рака. Для противораковой терапии композицию можно применять в комбинации с другим лечением, включая (но не 20 ограничиваясь только ими) химиотерапию, МАт к TIM-3, МАт к LAG-3, МАт к CD73, МАт к апелину, антитело к CTLA-4, МАт к EGFR, МАт к HER-2, МАт к CD19, МАт к CD20, МАт к CD33, МАт к TIG-1, МАт к CLDN18.2, антитело к PD-L1, антитело к PD-1, терапию на основе PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенный агент, лучевую терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетную 25 терапию или другие противораковые лекарственные средства.

В контексте настоящего описания понятие " в комбинации" касательно применения для пациента двух или большего количества терапий, относится к применению более чем одной терапии. Применение понятия "в комбинации" не 30 ограничивает порядок, в котором субъекта подвергают терапии. Например, первую терапию (например, композицию, указанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель,

6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второй терапии.

5 Варианты осуществления изобретения

В изобретении предложены следующие, не ограничивающие его объем, варианты осуществления.

Вариантом 1 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
10 содержащее/содержащий:

- а. первую тяжелую цепь, H1;
- б. вторую тяжелую цепь, H2;
- в. первую легкую цепь, L1; и
- г. вторую легкую цепь, L2;

15 в котором H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с первым антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, и
в которых H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается со вторым
20 антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, в котором

(а) H1 и H2 каждая содержит CH1-участок человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; и

25 (б) L1 и L2 каждая содержит CL-участок человеческой легкой каппа-цепи или человеческой легкой лямбда-цепи;

в которых H1L1 и H2L2 каждая содержит заряженную пару, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1-участке H1 и S114K/R в CL-участке L1 соответственно и G166K/R в CH1-участке H2 и S114D/E в CL-участке L2 соответственно;

30 (2) T187D/E в CH1-участке H1 и D/N170K/R в CL-участке L1 соответственно и T187K/R в CH1-участке H2 и D/N170D/E в CL-участке L2 соответственно;

(3) S131D/E в CH1-участке H1 и P119K/R в CL-участке L1 соответственно и S131K/R в CH1-участке H2 и P119D/E в CL-участке L2 соответственно;

(4) A129D/E в CH1-участке H1 и S121K/R в CL-участке L1 соответственно и A129K/R в CH1-участке H2 и S121D/E в CL-участке L2 соответственно;

5 (5) G166D/E в CH1-участке H2 и S114K/R в CL-участке L2 соответственно и G166K/R в CH1-участке H1 и S114D/E в CL-участке L1 соответственно;

(6) T187D/E в CH1-участке H2 и D/N170K/R в CL-участке L2 соответственно и T187K/R в CH1-участке H1 и D/N170D/E в CL-участке L1 соответственно;

10 (7) S131D/E в CH1-участке H2 и P119K/R в CL-участке L2 соответственно и S131K/R в CH1-участке H1 и P119D/E в CL-участке L1 соответственно; или

(8) A129D/E в CH1-участке H2 и S121K/R в CL-участке L2 соответственно и A129K/R в CH1-участке H1 и S121D/E в CL-участке L1 соответственно.

15 Вариантом 2 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 1 осуществления изобретения, в котором:

(а) две тяжелые цепи H1 и H2 каждая содержит VH-область, CH1-участок и Fc-область (которая содержит CH2- и CH3-участки), в которых VH-области имеют различные аминокислотные последовательности;

20 (б) две тяжелые цепи H1 и H2 каждая содержит VH-область, CH1-участок и Fc-область (которая содержит CH2- и CH3-участки), в которых CH1-участки имеют различные аминокислотные последовательности;

(в) две тяжелые цепи H1 и H2 каждая содержит VH-область, CH1-участок и Fc-область (которая содержит CH2- и CH3-участки), в которых Fc-области
25 имеют различные аминокислотные последовательности;

(г) две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых VL-области имеют различные аминокислотные последовательности;
и/или

30 (д) две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых CL-участки имеют различные аминокислотные последовательности.

Вариантом 3 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 2 осуществления изобретения, в котором H1 и H2 образуют гетеродимер.

Вариантом 4 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-3 осуществления изобретения, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

5 (а) отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) в положении G166, T187, S131 или A129 в CH1-участке H1, VH-область H1 и VL-область L1, имеющие замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно, и VH-область H2 и VL-область L2, имеющие замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно; или

10 (б) положительно заряженную аминокислоту (K или R) в положении G166, T187, S131 или A129 в CH1-участке H1, VH-область H1 и VL-область L1, имеющие замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно, и VH-область H2 и VL-область L2, имеющие замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно.

Вариантом 5 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-4 осуществления изобретения, в котором CH1- и CL-участки двух плечей содержат аминокислотные замены на аминокислотном остатке, соответствующем аминокислотному положению в SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20 для CH1 и в SEQ ID NO: 21 или 22 для CL, где аминокислотные замены в CH1- и CL-участках выбирают из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (2) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (3) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или
- (4) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;

25 где X выбирают из S, A или G.

Вариантом 6 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-5 осуществления изобретения, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47, а второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с ТАА, который экспрессируется на той же клетке, что и CD47, предпочтительно человеческим ТАА.

Вариантом 7 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 6 осуществления изобретения, в котором второй антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CLDN18.2, который экспрессируется на той же клетке, что и CD47, предпочтительно человеческим CLDN18.2.

Вариантом 8 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 6 или 7 осуществления изобретения, в котором анти-CD47 антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 29 соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 29 соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 30 соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 30 соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 33 соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 33 соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 34 соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 34 соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 37 соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 37 соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 38 соответственно;
- (12) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 38 соответственно;
- (13) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 41 соответственно;
- (14) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 41 соответственно;
- (15) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 42 соответственно;
- (16) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 42 соответственно;
- (17) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 45 соответственно;
- (18) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 45 соответственно;
- (19) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 46 соответственно;
- (20) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 46 соответственно;
- (21) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 49 соответственно;
- (22) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 49 соответственно;
- (23) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 50 соответственно;

- (24) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 50 соответственно;
- (25) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 53 соответственно;
- (26) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 53 соответственно;
- (27) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 54 соответственно;
- 5 (28) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 54 соответственно;
- (29) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 57 соответственно;
- (30) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 57 соответственно;
- (31) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 58 соответственно;
- (32) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 58 соответственно;
- 10 (33) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 29 соответственно;
- (34) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно;
- (35) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 30 соответственно;
- (36) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 30 соответственно;
- (37) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 33 соответственно;
- 15 (38) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 33 соответственно;
- (39) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 34 соответственно;
- (40) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 34 соответственно;
- (41) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 37 соответственно;
- (42) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 37 соответственно;
- 20 (43) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 38 соответственно;
- (44) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 38 соответственно;
- (45) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 41 соответственно;
- (46) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 41 соответственно;
- (47) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 42 соответственно;
- 25 (48) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 42 соответственно;
- (49) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 45 соответственно;
- (50) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 45 соответственно;
- (51) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 46 соответственно;
- (52) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 46 соответственно;
- 30 (53) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 49 соответственно;
- (54) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 49 соответственно;
- (55) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 50 соответственно;
- (56) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 50 соответственно;

(57) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 53 соответственно;

(58) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 53 соответственно;

(59) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 54 соответственно;

(60) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 54 соответственно;

5 (61) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 57 соответственно;

(62) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 57 соответственно;

(63) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 58 соответственно; или

(64) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 58 соответственно.

Вариантом 9 осуществления изобретения является выделенное

10 биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 8 осуществления изобретения, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, а второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

15 (1) SEQ ID NO: 1, 28, 2, 29, 3, 63, 4 и 64 соответственно;

(2) SEQ ID NO: 1, 36, 2, 37, 3, 67, 4 и 68 соответственно;

(3) SEQ ID NO: 1, 44, 2, 45, 3, 71, 4 и 72 соответственно;

(4) SEQ ID NO: 1, 52, 2, 53, 3, 73, 4 и 74 соответственно;

(5) SEQ ID NO: 1, 31, 2, 34, 3, 65, 4 и 66 соответственно;

20 (6) SEQ ID NO: 1, 39, 2, 42, 3, 69, 4 и 70 соответственно;

(7) SEQ ID NO: 1, 47, 2, 50, 3, 75, 4 и 76 соответственно;

(8) SEQ ID NO: 1, 55, 2, 58, 3, 77, 4 и 78 соответственно;

(9) SEQ ID NO: 23, 28, 24, 29, 59, 63, 60 и 64 соответственно;

(10) SEQ ID NO: 23, 36, 24, 37, 59, 67, 60 и 68 соответственно;

25 (11) SEQ ID NO: 23, 44, 24, 45, 59, 71, 60 и 72 соответственно;

(12) SEQ ID NO: 23, 52, 24, 53, 59, 73, 60 и 74 соответственно;

(13) SEQ ID NO: 25, 31, 26, 34, 61, 65, 62 и 66 соответственно;

(14) SEQ ID NO: 25, 39, 26, 42, 61, 69, 62 и 70 соответственно;

(15) SEQ ID NO: 25, 47, 26, 50, 61, 75, 62 и 76 соответственно; или

30 (16) SEQ ID NO: 25, 55, 26, 58, 61, 77, 62 и 78 соответственно.

Вариантом 10 осуществления изобретения является выделенное

биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-5 осуществления изобретения, где выделенное биспецифическое

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к модулятору иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент, и обладает способностью специфически связываться с ICM, предпочтительно человеческим ICM.

5 Вариантом 11 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 10 осуществления изобретения, где ICM выбирают из группы, которая состоит из CD3, CD16, CD27, CD28, CD40, CD122, NKp46, OX40, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, SIGLEC7, SIGLEC9, KIR, BTLA, B7-H3 и
10 других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

 Вариантом 12 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-5 и 10-11 осуществления изобретения, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3, предпочтительно
15 человеческим CD3, и содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно.

 Вариантом 13 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-5 и 10-12 осуществления изобретения, в котором первый
20 антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3, предпочтительно человеческим CD3, а второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3.

 Вариантом 14 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту
25 13 осуществления изобретения, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16.

30 Вариантом 15 осуществления изобретения является выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-14 осуществления изобретения.

Вариантом 16 осуществления изобретения является вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту 15 осуществления изобретения.

Вариантом 17 осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту 16 осуществления изобретения.

5 Вариантом 18 осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-14 осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

10 Вариантом 19 осуществления изобретения является способ таргетирования DLL3, который экспрессируется на поверхности раковой клетки у субъекта, который нуждается в этом, путем привлечения Т-клеток, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту 18 осуществления изобретения.

15 Вариантом 20 осуществления изобретения является способ таргетирования одного или двух антигенов, которые экспрессируются на поверхности раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, с использованием индуцируемой блокадой CD47 активации опосредуемого макрофагами фагоцитоза или опосредуемой CD3 активации Т-клеток, и/или лечения рака у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту фармацевтической
20 композиции, которая содержит выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-14 осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, где необязательно рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака ободочной кишки,
25 гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL),
30 хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелолейкоза (CLL), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Вариантом 21 осуществления изобретения является способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из вариантов 1-14 осуществления изобретения, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, пригодных для получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариантом 22 осуществления изобретения является способ получения фармацевтической композиции, которая содержит биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из вариантов 1-14 осуществления изобретения, включающий объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

Примеры

Пример 1: Конструирование биспецифических антител с заряженными парами

На фиг. 1 представлена схема биспецифического антитела (БсАт) с двумя различными тяжелыми цепями (H1 и H2) и двумя различными легкими цепями (L1 и L2) в виде гетеродимера H1H2, получение которого можно облегчать с помощью общепринятым подходов, таких как технология "knob-in-hole" и применение заряженных пар.

Для повышения правильного когнатного спаривания каждой тяжелой цепи с соответствующей ей легкой цепью (H1L1 и H2L2) можно интродуцировать противоположно заряженные аминокислоты в CH1- и CL-участки каждого плеча биспецифического антитела. Противоположно заряженная(ые) пара(ы) позволяет(ют) лучше различать физические свойства БсАт и возможных примесей, экспрессируемых клетками в процессе производства, облегчая отделение требуемого БсАт от примесей при хроматографии, и, как следствие, очистку и получение требуемого БсАт, и это делает возможным использовать для получения биспецифических антител обычно применяемую при производстве МАт платформу (включающей, как правило, использование аффинности к белку А, стадии анионообменной и катионообменной

хроматографии). В представленных ниже примерах применяли биспецифические антитела, имеющие последовательности СН1 тяжелой цепи человеческого IgG1 и СL легкой каппа-цепи (фиг. 2А-2Б и таблица 5). Указанную концепцию можно применять также для конструирования биспецифических антител с использованием СН1 тяжелой цепи человеческого IgG2, IgG3 или IgG4 (фиг. 2А и таблица 5) и СL человеческой легкой лямбда-цепи в тех случаях, если существуют консервативные сайты встраивания (нокина) (фиг. 2Б и таблица 5). В тех случаях, когда сайт нокина представляет собой нативный заряженный остаток, идентичный остатку требуемой заряженной аминокислоты, то его можно непосредственно использовать для образования требуемых заряженных пар. Созданные заряженные пары перечислены в таблице (они впервые описаны в WO 2021/126538, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки). В описанных заряженных парах G166D/E обозначает замену G в положении 166 (EU-нумерация) на D или E, в этом случае G166 находится в сайте нокина; D170D/E обозначает сохранение D в положении 170 или замену D в положении 170 на E; все другие замены обозначают в соответствии с таким же правилом. Последовательности VH и VL нескольких МАт, которые применяли для конструирования биспецифических антител, представлены на фиг. 2В-2Е и в таблице 2.

МАт к CD47 и к CLDN18.2 (фиг. 2В-2Г и таблица 2) применяли для конструирования биспецифических антител, в которые интродуцировали различные конструкции заряженных пар. Конструкции заряженных пар, которые применяли в биспецифических антителах анти-CD47/анти-CLDN18.2, перечислены в таблице 3. VH- и VL-области БсАт сливали с константными областями тяжелой цепи (HC) человеческого IgG1 и человеческой легкой каппа-цепи (LC) соответственно. Применяли стратегию смещения межцепочечной дисульфидной связи между HC и LC на плече МАт 1 (анти-CD47) к положению K133 на HC и положению F209 на LC. Эти стадии осуществляли согласно процедуре, описанной в WO 2021/126538, содержание указанной заявки в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. В БсАт, созданных на каркасе тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG1 (нумерация Кэбота для VH - и VL-областей; EU-нумерация для СН1- и СL-участков) тяжелая цепь (HC) МАт 1 (анти-CD47) имеет мутацию T366W (EU-

нумерация для CH2- и CH3-участков) для образования "выступа", а HC МАТ 2 (анти-CDN18.2) имеет мутации T366S, L368A и Y407V для образования "впадины", в результате чего две тяжелые цепи обладали преимуществом для получения БсАт с гетеродимерными HC (HC МАТ 1/HC МАТ 2). Кроме того, приводящую к замене на цистеин мутацию S354C интродуцировали в HC МАТ 1 и приводящую к замене на цистеин мутацию Y349C интродуцировали в HC МАТ 2 для стабилизации гетеродимерного спаривания тяжелых цепей гетеродимера (Merchant и др., Nat. Biotechnol. 16(7), 1998, сс. 677-681). Биспецифическими антителами анти-CD47/анти-CLDN18.2 с различными созданными заряженными парами (таблица 3) трансфектировали клетки ExpiCHO-S, и одновременная экспрессия двух тяжелых цепей и двух легких цепей в одной и той же клетке в результате приводила к экспрессии и сборке требуемого БсАт и образованию некоторых примесей. Биспецифические антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А.

МАТ к CD3 и гуманизированное МАТ к DLL3 (описанные в публикации международной заявки на патент WO 2019/217145, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки) применяли для конструирования анти-CD3/анти-DLL3 БсАт (фиг. 2Д-2Е и таблица 2). VH- и VL-области БсАт сливали с константными областями тяжелой цепи (HC) и легкой каппа-цепи (LC) соответственно человеческого IgG1. Заряженные пары HC (Q39E, T187E)/LC (Q38K, D170K) интродуцировали в анти-DLL3-плечо БсАт; заряженные пары HC (Q39K, T187K)/LC (Q38E, D170E) интродуцировали в анти-CD3-плечо БсАт. Стратегию смещения межцепочечной дисульфидной связи между HC и LC на МАТ 2-плече (анти-DLL3) к положению K133 на HC и положению F209 на LC применяли для того, что способствовать экспрессии, очистке и/или получению БсАт, а также для повышения стабильности требуемого БсАт при совместной трансфекции двумя HC и двумя LC в трансфектированных клетках. Эти стадии осуществляли согласно описанному в WO 2021/126538, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. Последовательности VH, CH1, VL и CL полученного в результате БсАт (обозначено как bsAb_33) представлены в таблице 4.

Как описано выше, bsAb_33 имеет каркас тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG1 (нумерация Кэбота для VH - и VL-областей; EU-нумерация для CH1- и CL-участков. HC МАт 1 (анти-CD47) имеет мутацию T366W (EU-нумерация для CH2- и CH3-участков) для образования "выступа", а HC МАт 2 (анти-DLL3) имеет мутации T366S, L368A и Y407V для образования "впадины", в результате чего две тяжелые цепи образовывали преимущественно БсАт с гетеродимерными HC (HC МАт 1/ HC МАт 2), а не с гомодимерными HC (HC МАт 1/HC МАт 1 или HC МАт 2/HC МАт 2). Кроме того, приводящую к замене на цистеин мутацию S354C интродуцировали в HC МАт 1 и приводящую к замене на цистеин мутацию Y349C интродуцировали в HC МАт 2 для стабилизации гетеродимерного спаривания тяжелых цепей гетеродимера (Merchant и др., Nat. Biotechnol. 16(7), 1998, сс. 677-681). Кроме того, мутации L234A и L235A интродуцировали в CH2-участки и H1, и H2.

БсАт, обозначенным как bsAb_33, трансфектировали клетки ExpiCHO-S, и одновременная экспрессия двух тяжелых цепей и двух легких цепей в одной и той же клетке в результате приводила к экспрессии и сборке требуемого БсАт и образованию некоторых примесей. БсАт очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А.

Таблица 1: Аминокислотные остатки в CH1- и CL-участках, предназначенные для образования заряженных пар

Обозначение заряженной пары	CH1	CL
G166/S114	G166	S114
T187/D170	T187	D170
S131/P119	S131	P119
A129/S121	A129	S121

Примечание: для CH1- и CL-участков применяли EU-нумерацию

Таблица 2: Последовательности различных областей в биспецифических антителах анти-CD47/анти-CLDN18.2 и анти-CD3/анти-DLL3

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
VH анти-CD47	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAGTDLAYWGQGLTVSS	1
VL анти-CD47	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINVWLSWYQQKPGQAPRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPTFGQGTKVEIK	2

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
VH анти-CLDN18.2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPGKGLEWV AYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLTAEDTAVYYC ARGGFYGNLDYWGQGTLLTVSS	3
VL анти-CLDN18.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSLSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGKA PKLLIYWASTRESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYSCQNAYS Y4 PLTFGQGTKVEIK	4
VH анти-CD3	DIKLTQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWV GYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA 5 RYYDDHYSLDYWGQGTLLTVSS	5
VL анти-CD3	DIQLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSVSVMNHWYQQKSGTSPKRWIY DTSKVASGVPIRFGSGSGTSLTISSMEAEADAATYYCQQWSSNPLTF 6 GAGTKLELK	6
VH анти-DLL3	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQAPGRRPEW IGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSKYSDTAFLELRSLTSDDTAVYYC 7 ARGGYDYDGDYWGGRGAPVTVSS	7
VL анти-DLL3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQININWLSWYQQKPGQAPRLLIYK 8 ASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPTFGQ GTKVEIK	8

Таблица 3: Конструкции заряженных пар в биспецифических антителах анти-CD47/анти-CLDN18.2

БсАт	Плечо	Мутации в VH	Мутации в VL	Мутации в CH1	Мутации в CL
WT	Анти-CD47				
	Анти-CLDN18.2				
PAC12	Анти-CD47			C220S; K133C	C214S; F209C
	Анти-CLDN18.2				
Ek	Анти-CD47	Q39E	Q38K	C220S; K133C	C214S; F209C
	Анти-CLDN18.2	Q39K	Q38E		
Ke	Анти-CD47	Q39K	Q38E	C220S; K133C	C214S; F209C
	Анти-CLDN18.2	Q39E	Q38K		
EK (gs)	Анти-CD47			C220S; K133C; G166E	C214S; F209C; S114K
	Анти-CLDN18.2			G166K	S114E
EK (td)	Анти-CD47			C220S; K133C; T187E	C214S; F209C; D170K
	Анти-CLDN18.2			T187K	D170E
EK (5)	Анти-CD47			C220S; K133C; S131E	C214S; F209C; P119K
	Анти-CLDN18.2			S131K	P119E
EK (9)	Анти-CD47			C220S; K133C; A129E	C214S; F209C; S121K
	Анти-CLDN18.2			A129K	S121E
KE (gs)	Анти-CD47			C220S; K133C;	C214S; F209C;

БсАт	Плечо	Мутации в VH	Мутации в VL	Мутации в CH1	Мутации в CL
				G166K	S114E
	Анти-CLDN18.2			G166E	S114K
КЕ (td)	Анти-CD47			C220S; K133C; T187K	C214S; F209C; D170E
	Анти-CLDN18.2			T187E	D170K
КЕ (5)	Анти-CD47			C220S; K133C; S131K	C214S; F209C; P119E
	Анти-CLDN18.2			S131E	P119K
КЕ (9)	Анти-CD47			C220S; K133C; A129K	C214S; F209C; S121E
	Анти-CLDN18.2			A129E	S121K
кеКЕ (gs)	Анти-CD47	Q39E	Q38K	C220S; K133C; G166E	C214S; F209C; S114K
	Анти-CLDN18.2	Q39K	Q38E	G166K	S114E
кеКЕ (td)	Анти-CD47	Q39E	Q38K	C220S; K133C; T187E	C214S; F209C; D170K
	Анти-CLDN18.2	Q39K	Q38E	T187K	D170E
кеКЕ (5)	Анти-CD47	Q39E	Q38K	C220S; K133C; S131E	C214S; F209C; P119K
	Анти-CLDN18.2	Q39K	Q38E	S131K	P119E
кеКЕ (9)	Анти-CD47	Q39E	Q38K	C220S; K133C; A129E	C214S; F209C; S121K
	Анти-CLDN18.2	Q39K	Q38E	A129K	S121E
кеКЕ (gs)	Анти-CD47	Q39K	Q38E	C220S; K133C; G166K	C214S; F209C; S114E
	Анти-CLDN18.2	Q39E	Q38K	G166E	S114K
кеКЕ (td)	Анти-CD47	Q39K	Q38E	C220S; K133C; T187K	C214S; F209C; D170E
	Анти-CLDN18.2	Q39E	Q38K	T187E	D170K
кеКЕ (5)	Анти-CD47	Q39K	Q38E	C220S; K133C; S131K	C214S; F209C; P119E
	Анти-CLDN18.2	Q39E	Q38K	S131E	P119K
кеКЕ (9)	Анти-CD47	Q39K	Q38E	C220S; K133C; A129K	C214S; F209C; S121E
	Анти-CLDN18.2	Q39E	Q38K	A129E	S121K

Примечание: БсАт - биспецифическое антитело. Для VH- и VL-областей применяли нумерацию Кэбота; для CH1- и CL-участков применяли EU-нумерацию; незаполненная клетка означает, что мутацию не интродуцировали.

Таблица 4: Последовательности различных областей в биспецифическом антителе анти-CD3/анти-DLL3 bsAb₃₃

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CD3 VH ₃₃	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK <u>K</u> RPGQGL EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	9
Анти-CD3 CH1 ₃₃	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV <u>V</u> KVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC	10
Анти-CD3 VL ₃₃	DIQLTQSPAIMASPGKEVTMTCRASSSVSYMNWYQ <u>E</u> KSGTSPKRW IYDTSKVASGVPIRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSN PLTFGAGTKLELK	11
Анти-CD3 CL ₃₃	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSK <u>E</u> STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	12
Анти-DLL3 VH ₃₃	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWV <u>R</u> EAPGRRP EWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLRLSLTSDDT AVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSS	13
Анти-DLL3 CH1 ₃₃	ASTKGPSVFPLAPSS <u>C</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV <u>V</u> VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPK <u>S</u>	14
Анти-DLL3 VL ₃₃	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCHASQNINWLSWYQ <u>K</u> KPGQAPRLI IYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQSY FTFGQGTKVEIK	15
Анти-DLL3 CL ₃₃	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSK <u>K</u> STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKS <u>C</u> NRGES	16

Примечание: Остатки, являющиеся результатом аминокислотных замен, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

5

Таблица 5: Последовательности областей IgG1 CH1, IgG2 CH1, IgG3 CH1, IgG4 CH1, каппа CL и лямбда CL

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC	17
IgG2 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CC	18
IgG3 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEL KTPLG	19
IgG4 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YG	20
Каппа CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	21
Лямбда CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA	22

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
	GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTEC	

Пример 2: Свойства биспецифических антител анти-CD47/анти-CLDN18.2 с заряженными парами

Биспецифические антитела анти-CD47/анти-CLDN18.2 с одной заряженной парой в каждом из них получали в клетках EpxiCHO-S путем их трансфекции ДНК обоих плечей в соотношении 1:1 (стандартное соотношение). В качестве контролей применяли WT и PAC12 (таблица 3). Полученные в результате трансфекций образцы после очистки с помощью белка А анализировали с использованием мостикового ELISA-анализа для подтверждения образования требуемых биспецифических антител (фиг. 3А-3Б). Мостиковый ELISA-анализ осуществляли с использованием клеток EpxiCHO-S, стабильно экспрессирующих человеческий CLDN18.2, на планшете, предназначенном для захвата БсАт. Добавляли биотинилированный человеческий белок CD47 для связывания с захваченным БсАт и детекцию осуществляли, используя конъюгированный с HRP стрептавидин. Очищенные с помощью белка А образцы анализировали также с помощью СЕХ-ЖХВР наряду со стандартами их основных примесей (фиг. 3В-3О). СЕХ-ЖХВР проводили с использованием линейного градиента соли [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 6,0) и 2% ацетонитрила; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 6,0), 1М NaCl и 2% ацетонитрила]. По сравнению с образцами WT, PAC12, ек или ке (фиг. 3В-3Е) представляющая собой ошибочное спаривание примесь 2Х анти-CD47 LC отделена от основного пика в образцах БсАт "ЕК" [(включая ЕК (gs), ЕК (td), ЕК (5) и ЕК (9); таблица 3] (фиг. 3Ж-3К). Кроме того, обе представляющие собой ошибочное спаривание примеси 2Х анти-CD47 и 2Х анти-CLDN18.2 LC отделены от основного пика в образцах БсАт "КЕ" [включая КЕ (gs), КЕ (td), КЕ (5) и КЕ (9); таблица 3] (фиг. 3Л-3О). Указанные данные свидетельствуют о том, что заряженные пары "ЕК" и "КЕ" позволяют отличать физические свойства одной или обеих примесей, представляющих собой ошибочные спаривания LC, от физических свойств БсАт с помощью катионообменной хроматографии (СЕХ) с использованием линейного градиента соли и могут облегчать отделение БсАт

от одной или обеих примесей, представляющих собой ошибочные спаривания LC, с использованием СЕХ-хроматографии. Указанное свойство может облегчать очистку и производство БсАт в условиях производства. Очищенные с помощью белка А образцы анализировали с помощью жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Результаты свидетельствуют о том, что требуемое БсАт присутствовало в каждом образце и обе представляющие собой ошибочные спаривания LC примеси 2X анти-CD47 и 2X анти-CLDN18.2, обнаружены в указанных образцах (фиг. 3П-3С) за исключением варианта ЕК(9), в котором ошибочное спаривание 2X анти-CD47 LC практически не поддавалось обнаружению (фиг. 3Р).

Биспецифические антитела анти-CD47/анти-CLDN18.2 с одной парой из заряженных пар "ЕК" в каждом из них (таблица 3) получали в клетках ExpiCHO-S путем трансфекции ДНК анти-CD47 LC и ДНК анти-CLDN18.2 LC в соотношении 2:1 (ДНК анти-CD47 LC : ДНК анти-CLDN18.2 LC = 2:1; смещенное соотношение ДНК). WT и PAC12 (таблица 3) применяли в качестве контролей. Очищенные с помощью белка А образцы, полученные после трансфекций биспецифическими антителами "ЕК" анализировали с использованием мостикового ELISA-анализа для подтверждения образования требуемых биспецифических антител (фиг. 4А). Очищенные с помощью белка А образцы анализировали также с использованием СЕХ-ЖХВР параллельно со стандартами их основных примесей, используя линейный градиент соли, как описано выше. В случае трансфекций с использованием смещенного соотношения ДНК двух разных LC получали относительно в большем количестве представляющую собой ошибочное спаривание примесь 2X анти-CD47 LC (фиг. 4Б). Присутствие основных видов примесей анализировали с использованием ЖХ/МС (фиг. 4В-4Г). Очищенные с помощью белка А образцы разделяли с использованием СЕХ-FPLC, применяя линейный градиент рН [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 5,8) и 50мМ NaCl; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 8,0) и 50мМ NaCl]. В отличие от образцов WT, PAC12, ек или ке, для которых обнаружен один пик (фиг. 4Д), в "ЕК"-образцах обнаружено разделение основного пика (пик 1, в котором присутствует БсАт) и пик, соответствующий одному из видов примесей, представляющих собой ошибочное спаривание LC (фиг. 4Е). Собранные фракции из пиков анализировали с помощью описанного

выше мостикового ELISA-анализа (фиг. 4Ж). Результаты свидетельствуют о том, что в каждом образце пик 1 соответствует БсАт (фиг. 4Ж). В отличие от образцов WT, PAC12, ек и ке, для которых не обнаружено отделение БсАт от представляющей ошибочное спаривание примеси 2X анти-CD47 LC после СЕХ-FPLC (фиг. 43), пик 1 в каждом из очищенных с помощью СЕХ-FPLC "ЕК"-образцов соответствовал требуемому БсАт в качестве основного продукта (фиг. 4И-4К). Эти данные продемонстрировали, что путем интродукции заряженных пар в "ЕК"-конструкции БсАт основное БсАт можно отделять от представляющих ошибочное спаривание примесей 2X анти-CD47 LC с помощью СЕХ-FPLC, используя линейный градиент рН, что свидетельствует о том, что заряженные пары обладают превосходными свойствами, облегчающими очистку БсАт.

Как описано выше, очищенные с помощью белка А образцы БсАт с заряженными парами "КЕ", полученные после трансфекции с использованием стандартного соотношения ДНК, анализировали, используя мостиковый ELISA-анализ (фиг. 3Б), СЕХ-ЖХВР (фиг. 3Л-3О) и ЖХ/МС (фиг. 3С). Указанные образцы разделяли также с помощью СЕХ-FPLC, используя линейный градиент рН [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 5,8) и 50мМ NaCl; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 8,0) и 50мМ NaCl]. В отличие от образцов WT, PAC12, ек и ке, которые обнаружены в виде одного пика (фиг. 4Д), "КЕ"-образцы разделялись на основной пик (пик 1, в котором присутствовало БсАт), и пики, соответствующие обоим видам примесей, представляющих собой ошибочное спаривание LC (фиг. 5А). Собранные фракции из пиков анализировали с помощью мостикового ELISA-анализа (фиг. 5Б) и ЖХ/МС (фиг. 5В-5Е). Результаты свидетельствуют о том, что в каждом образце пик 1 соответствует БсАт (фиг. 5А). В отличие от образцов WT, PAC12, ек и ке, для которых не обнаружено отделение БсАт от представляющей ошибочное спаривание примеси 2X анти-CD47 LC после СЕХ-FPLC (фиг. 43), пик 1 в каждом из очищенных с помощью СЕХ-FPLC "КЕ"-образцов соответствовал требуемому БсАт в качестве основного продукта (фиг. 5В-5Е). Эти данные продемонстрировали, что путем интродукции заряженных пар в "КЕ"-конструкции БсАт основное БсАт можно отделять от представляющих ошибочное спаривание примесей 2X анти-CD47 LC и 2X анти-CLDN18.2 LC с помощью СЕХ-FPLC, используя линейный градиент рН, что

свидетельствует о том, что заряженные пары обладают превосходными свойствами, облегчающими очистку БсАт.

Очищенные с помощью белка А "ЕК"-образцы БсАт, полученные после трансфекции с использованием смещенного соотношения ДНК, очищали, используя методы поэтапного элюирования [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 5,8) и 80мМ NaCl; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 8,0) и 40мМ NaCl]. Метод оптимизировали для каждого образца БсАт. "ЕК"-варианты биспецифических антител очищали с использованием соответствующего БсАт основного пика (пик 1), отделенного от соответствующего(их) примесей пика(ов) (фиг. 6А).

10 Присутствие в основном пике требуемого БсАт подтверждали с использованием мостикового ELISA-анализа (фиг. 6Б) и ЖХ/МС-анализа (фиг. 6В-6Е).

Указанные данные продемонстрировали, что биспецифические антитела с заряженными парами можно очищать с помощью СЕХ-FPLC, используя методы поэтапного элюирования.

15 Конструкции биспецифических антител, включающие заряженные пары "екЕК" или "кеКЕ" (таблица 3), получали в клетках ExpiCHO-S, трансфектированных ДНК обеих плечей при стандартном соотношении ДНК 1:1.

Очищенные на белке А образцы этих конструкций тестировали с помощью мостикового ELISA-анализа для подтверждения биспецифической активности

20 (фиг. 7А). Эти же образцы анализировали также с помощью СЕХ-ЖХВР с использованием описанного выше линейного градиента соли параллельно с соответствующими стандартами основных примесей (фиг. 7Б-7И) и с помощью ЖХ/МС (фиг. 7К-7Л).

Очищенные с помощью белка А "екЕК"-образцы БсАт разделяли на СЕХ-FPLC, используя линейный градиент рН [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 5,8) и 50мМ NaCl; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 8,0) и 50мМ NaCl] согласно описанному выше методу. По сравнению с образцами WT, РАС12, ек и ке (фиг. 4Д) "екЕК"-образцы БсАт характеризовались лучшим отделением основного пика (пик 1, в котором присутствует БсАт) от одного из видов примесей, представляющих собой ошибочное спаривание LC (фиг. 8А).

30 Собранные фракции из пиков анализировали для подтверждения присутствия БсАт в пике 1 с помощью такого же мостикового ELISA-анализа (фиг. 8Б) и ЖХ/МС-анализа (фиг. 8В-8Е). Аналогично указанному, "кеКЕ"-образцы БсАт характеризовались лучшим отделением основного пика (пик 1, в котором

присутствует БсАт) от одного или двух видов примесей, представляющих собой ошибочное спаривание LC (фиг. 8Ж), по сравнению с образцами WT, PAC12, ек и ке (фиг. 4Д). Собранные фракции из пиков анализировали для подтверждения присутствия БсАт в пике 1 с помощью такого же мостикового ELISA-анализа (фиг. 83) и ЖХ/МС-анализа (фиг. 8И-8М). Биспецифические антитела "кеКЕ (gs)" и "еКЕ (td)" отделяли от обоих видов ошибочных спариваний 2Х анти-CD47 LC и 2Х CLDN18.2 LC (фиг. 8И-8К). Биспецифические антитела "кеКЕ (5)" и "кеКЕ (9)" отделяли от ошибочного спаривания 2Х анти-CD47 LC (фиг. 8Л-8М); ошибочное спаривание 2Х CLDN18.2 LC не обнаружено.

10 Два биспецифических антитела "еКЕК" (фиг.9А) и четыре биспецифических антитела "кеКЕ" (фиг. 9Д) очищали с использованием общепринятых методов поэтапного элюирования [буфер А: 25мМ фосфат натрия (рН 5,8) и 80мМ NaCl; буфер Б: 25мМ фосфат натрия (рН 8,0) и 40мМ NaCl] с помощью СЕХ-FPLC и активность очищенных биспецифических антител подтверждали с помощью
 15 мостикового ELISA-анализа (фиг. 9Б и 9Е) и ЖХ/МС-анализа (фиг. 9В-9Г и 9Ж-9К). Эти результаты свидетельствуют о том, что представленные в таблице 1 заряженные пары можно применять путем объединения с другими заряженными парами (конструкции ек или ке; таблица 3) для облегчения очистки БсАт с помощью СЕХ-FPLC. Последовательности различных областей плеча,
 20 представляющего собой антитело к CD47, и плеча, представляющего собой антитело к CLDN18.2, с различными конструкциями заряженных пар представлены в таблице 6. Указанные последовательности антитела к CD47 можно применять для создания биспецифических антител с плечом, представляющим собой другое антитело, такое, как антитело к CLDN18.2, в
 25 которые можно интродуцировать соответствующие заряженные пары, конструкции которых представлены в таблице 3.

Таблица 6: Последовательности различных областей плеча, представляющего собой антитело к CD47, и плеча, представляющего собой антитело к CLDN18.2, с заряженными парами

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CD47 VH Q39E	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVREAP GQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLTVDKSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCAGTDLAYWGQGTLLTVSS	23
Анти-CD47 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQININWLSWYQKKPGQA	24

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
Q38K	PRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQGQSYPF T FGQGTKVEIK	
Анти-CD47 VH Q39K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRKAP GQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLTVDKSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCAGTDLAYWGQGLTVTVSS	25
Анти-CD47 VL Q38E	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINVWLSWYQEKPGQA PRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQGQSYPF T FGQGTKVEIK	26
Анти-CD47 CH1 G166D	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS D VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	27
Anti-CD47 CH1 G166E	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS E VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	28
Анти-CD47 CL S114K	RTVAAPKVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	29
Анти-CD47 CL S114R	RTVAAPRVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	30
Анти-CD47 CH1 G166K	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS K VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	31
Анти-CD47 CH1 G166R	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS R VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	32
Анти-CD47 CL S114D	RTVAAP D VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	33
Анти-CD47 CL S114E	RTVAAPEVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	34
Анти-CD47 CH1 T187D	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLSSV D VPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	35
Анти-CD47 CH1 T187E	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLSSV E VPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	36
Анти-CD47 CL D170K	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK K STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	37
Анти-CD47 CL D170R	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK R STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	38
Анти-CD47 CH1 T187K	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLSSV V KVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSS	39
Анти-CD47 CH1 T187R	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLSSV R VPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSS	40
Анти-CD47 CL D170D	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK D STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	41

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CD47 CL D170E	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK E STYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	42
Анти-CD47 CH1 S131D	ASTKGPSVFPLAP D S C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	43
Анти-CD47 CH1 S131E	ASTKGPSVFPLAP E S C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	44
Анти-CD47 CL P119K	RTVAAPSVFIF K PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	45
Анти-CD47 CL P119R	RTVAAPSVFIF R PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	46
Анти-CD47 CH1 S131K	ASTKGPSVFPLAP K S C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	47
Анти-CD47 CH1 S131R	ASTKGPSVFPLAP R S C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	48
Анти-CD47 CL P119D	RTVAAPSVFIF D PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	49
Анти-CD47 CL P119E	RTVAAPSVFIF E PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	50
Анти-CD47 CH1 A129D	ASTKGPSVFPL D PSS C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	51
Анти-CD47 CH1 A129E	ASTKGPSVFPL E PSS C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	52
Анти-CD47 CL S121K	RTVAAPSVFIFPP K DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	53
Анти-CD47 CL S121R	RTVAAPSVFIFPP R DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	54
Анти-CD47 CH1 A129K	ASTKGPSVFPL K PSS C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	55
Анти-CD47 CH1 A129R	ASTKGPSVFPL R PSS C STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPK S	56
Анти-CD47 CL S121D	RTVAAPSVFIFPP D DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	57
Анти-CD47 CL S121E	RTVAAPSVFIFPP E DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTK S CNRGES	58
Анти-CLDN18.2 VH Q39K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSFGMHWVR K APG KGLEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLTAEDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGLVTVSS	59

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CLDN18.2 VL Q38E	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSL L NSGNQKNYLTWYQ E KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYSCQNAYSYP L TFGQGTKVEIK	60
Анти-CLDN18.2 VH Q39E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSFGMHWVR E APGK GLEWVAYISSGRSTMY Y ADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNS LTAEDTAVYYCARGGFYGN S LDYWGQGLVTVSS	61
Анти-CLDN18.2 VL Q38K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSL L NSGNQKNYLTWYQ K KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYSCQNAYSYP L TFGQGTKVEIK	62
Анти-CLDN18.2 CH1 G166K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALT S KVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	63
Анти-CLDN18.2 CL S114E	RTVAAP E VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	64
Анти-CLDN18.2 CH1 G166E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALT S EVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	65
Анти-CLDN18.2 CL S114K	RTVAAP K VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66
Анти-CLDN18.2 CH1 T187K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V KVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	67
Анти-CLDN18.2 CL D170E	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK E STYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	68
Анти-CLDN18.2 CH1 T187E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V EVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	69
Анти-CLDN18.2 CL D170K	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK K STYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	70
Анти-CLDN18.2 CH1 S131K	ASTKGPSVFPLAP K SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	71
Анти-CLDN18.2 CL P119E	RTVAAPSVFIF E PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	72
Анти-CLDN18.2 CH1 A129K	ASTKGPSVFPL K PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	73
Анти-CLDN18.2 CL S121E	RTVAAPSVFIFPP E DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	74
Анти-CLDN18.2 CH1 S131E	ASTKGPSVFPLAP E SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	75
Анти-CLDN18.2 CL P119K	RTVAAPSVFIF K PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS T LTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	76
Анти-CLDN18.2 CH1 A129E	ASTKGPSVFPL E PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	77

Обозначение участка	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CLDN18.2 CL S121K	RTVAAPSVFIFPP K DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	78

Примечание: Остатки, являющиеся результатом аминокислотных замен, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

5 Пример 3: Свойства биспецифических антител анти-CD3/анти-DLL3 с заряженными парами

Значение pH очищенных с помощью белка А образцов БсАт анти-CD3/анти-DLL3 доводили до конечного значения 5,5 и вносили на колонку СЕХ-колонку rogos XS (фирма Thermo), предварительно уравновешенную 25мМ фосфатом натрия (pH 5,8) + 210мМ NaCl. Образцы элюировали с использованием линейного градиента [буфер А – 25мМ фосфат натрия (pH 5,8) + 210мМ NaCl; буфер Б – 25мМ фосфат натрия (pH 8) + 115мМ NaCl].

Элюированные фракции анализировали с помощью сильной катионообменной (SCX) ЖХВР, и объединяли фракции, в которых обнаружено полное элиминирование ошибочного спаривания 2Х анти-DLL3 LC (гетеродимер НС с соответствующей LC антитела к DLL3 на обоих плечах). К объединенным фракциям добавляли (NH₄)₂SO₄ до конечной концентрации 700мМ и образцы непосредственно вносили на колонку Butyl Sepharose™ High Performance (фирма Cytiva) для НИС (хроматография с гидрофобным взаимодействием),

предварительно уравновешенную 50мМ Трис (pH 7,5) + 700мМ (NH₄)₂SO₄ + 3% глицерина. Образцы элюировали с использованием линейного градиента [буфер А – 50мМ Трис (pH 7,5) + 700мМ (NH₄)₂SO₄ + 3% глицерина; буфер Б – 50мМ Трис (pH 7,5) + 10% глицерина]. Элюированные фракции анализировали с помощью НИС-ЖХВР, и фракции, в которых обнаружено полное элиминирование ошибочного спаривания 2Х анти-CD3 LC (гетеродимер НС с соответствующей LC антитела к DLL3 на обоих плечах), объединяли в виде очищенного белка.

Очищенные биспецифические антитела анализировали с помощью НИС-ЖХВР, SCX-ЖХВР и SEC-ЖХВР (фиг. 10А-10В). Стандарты возможных примесей создавали, используя кратковременную трансфекцию только

компонентами для данной примеси (т.е. требуемыми для создания ошибочного спаривания 2Х анти-CD3 L, для трансфекции применяли только НС антитела к DLL3, НС антитела к CD3 и LC антитела к CD3 для усиления образования стандарта ошибочного спаривания LC антитела к D3; гомодимер/полумолекулу создавали путем трансфекции клеток НС и LC только данного плеча), очищали с помощью белка А и применяли в качестве эталонов при анализов (фиг. 10А-10Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что очищенное антитело bsAb_33 имело высокую степень чистоты.

Для оценки связывающей активности bsAb_33 одновременно и с DLL3, и с CD3 очищенное БсАт инкубировали с клетками SHP-77 и клетками Jurkat, которые метили различными флуоресцентными маркерами. Выявляли случай двойного окрашивания, индуцированный bsAb_33, и количественно оценивали с помощью проточной цитометрии. В целом, метод состоял в следующем: клетки Jurkat окрашивали красителем Violet Proliferation Dye 450 (фирма BD, каталожный номер: 562158), а клетки SHP-77 окрашивали CFSE (фирма ThermoFisher, каталожный номер: 34554) согласно протоколу производителя. Затем меченные клетки SHP-77 и Jurkat инкубировали в соотношении 1:1 с 2 мкг/мл bsAb_33. Для блокады МАт клетки SHP-77 обрабатывали 4,5мкМ анти-DLL3 блокирующим МАт в течение 10 мин при комнатной температуре перед инкубацией с клетками Jurkat, используя в конечной концентрации 1,5мкМ анти-DLL3 блокирующее МАт, или клетки Jurkat обрабатывали 4,5мкМ анти-CD3 блокирующим МАт в течение 10 мин при комнатной температуре перед инкубацией с клетками SHP-77, используя в конечной концентрации 1,5мкМ анти-CD3 блокирующее МАт. После инкубации в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 1 ч клетки фиксировали с помощью 2% формальдегида, однократно промывали TBS, ресуспендировали в FACS-буфере (HBSS, 0,1% БСА, 0,05% азида натрия) и затем анализировали с помощью проточной цитометрии (цитометр Attune NxT). Перекрестное сшивание двух типов клеток в присутствии bsAb_33 выявляли с помощью FACS и сигнал ингибировали с помощью анти-DLL3 или анти-CD3 блокирующего МАт (фиг. 11А). Полученные данные продемонстрировали, что конструкция bsAb_33 функционируют в качестве БсАт.

БсАт, обозначенное как bsAb_33, применяли также для активации Т-клеток с использованием анализа функциональной активации Т-клеток. Применяли репортерную клеточную линию Jurkat NFAT Luciferase (фирма BPS Bioscience), в которой экспрессия люциферазы светлячка происходит только при активации, включая активацию, опосредуемую CD3. Репортерные клетки инкубировали с клетками-мишенями SHP-77 в присутствии bsAb_33 и в присутствии анти-DLL3 блокирующего антитела или без него в течение 22 ч в среде для роста при 37°C в СО₂-инкубаторе. Затем клетки анализировали в отношении активации с помощью реагента для детекции люциферазы и люминометра. Установлено, что БсАт bsAb_33 индуцировало зависящую от дозы активацию репортерных клеток при инкубации с клеткой-мишенью SHP-77, и сигнал ингибировался анти-DLL3 блокирующим антителом (МАт-версия анти-DLL3-плеча (фиг. 11Б), демонстрируя, что bsAb_33 обладает способностью привлекать Т-клетки.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что в описанные выше варианты осуществления изобретения можно вносить изменения без отклонения от концепции изобретения в широком смысле. Таким образом, должно быть очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления изобретения, а подразумевается, что оно охватывает модификации, соответствующие сущности и объему настоящего изобретения, которые указаны в настоящем описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее/содержащий:

- 5 а. первую тяжелую цепь, H1;
б. вторую тяжелую цепь, H2;
в. первую легкую цепь, L1; и
г. вторую легкую цепь, L2;

10 в котором H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с первым антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, и в которых H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается со вторым антигеном, предпочтительно первым антигеном человеческого происхождения, в
15 котором

(а) H1 и H2 каждая содержит CH1-участок человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; и

(б) L1 и L2 каждая содержит CL-участок человеческой легкой каппа-цепи или человеческой легкой лямбда-цепи;

20 в которых H1L1 и H2L2 каждая содержит заряженную пару, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1-участке H1 и S114K/R в CL-участке L1 соответственно и G166K/R в CH1-участке H2 и S114D/E в CL-участке L2 соответственно;

25 (2) T187D/E в CH1-участке H1 и D/N170K/R в CL-участке L1 соответственно и T187K/R в CH1-участке H2 и D/N170D/E в CL-участке L2 соответственно;

(3) S131D/E в CH1-участке H1 и P119K/R в CL-участке L1 соответственно и S131K/R в CH1-участке H2 и P119D/E в CL-участке L2 соответственно;

30 (4) A129D/E в CH1-участке H1 и S121K/R в CL-участке L1 соответственно и A129K/R в CH1-участке H2 и S121D/E в CL-участке L2 соответственно;

(5) G166D/E в CH1-участке H2 и S114K/R в CL-участке L2 соответственно и G166K/R в CH1-участке H1 и S114D/E в CL-участке L1 соответственно;

(6) T187D/E в СН1-участке Н2 и D/N170K/R в CL-участке L2 соответственно и T187K/R в СН1-участке Н1 и D/N170D/E в CL-участке L1 соответственно;

5 (7) S131D/E в СН1-участке Н2 и P119K/R в CL-участке L2 соответственно и S131K/R в СН1-участке Н1 и P119D/E в CL-участке L1 соответственно; или

(8) A129D/E в СН1-участке Н2 и S121K/R в CL-участке L2 соответственно и A129K/R в СН1-участке Н1 и S121D/E в CL-участке L1 соответственно.

10 2. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором:

(а) две тяжелые цепи Н1 и Н2 каждая содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых VH-области имеют различные аминокислотные последовательности;

15 (б) две тяжелые цепи Н1 и Н2 каждая содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых СН1-участки имеют различные аминокислотные последовательности;

(в) две тяжелые цепи Н1 и Н2 каждая содержит VH-область, СН1-участок и Fc-область (которая содержит СН2- и СН3-участки), в которых Fc-области имеют различные аминокислотные последовательности;

20 (г) две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых VL-области имеют различные аминокислотные последовательности; и/или

(д) две легкие цепи L1 и L2 каждая содержит VL-область и CL-участок, в которых CL-участки имеют различные аминокислотные последовательности.

25 3. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в котором Н1 и Н2 образуют гетеродимер.

30 4. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-3, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) отрицательно заряженную аминокислоту (D или E) в положении G166, T187, S131 или A129 в СН1-участке Н1, VH-область Н1 и VL-область L1,

имеющие замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно, и VH-область H2 и VL-область L2, имеющие замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно; или

5 (б) положительно заряженную аминокислоту (K или R) в положении G166, T187, S131 или A129 в CH1-участке H1, VH-область H1 и VL-область L1, имеющие замещающие мутации Q39K и Q38E соответственно, и VH-область H2 и VL-область L2, имеющие замещающие мутации Q39E и Q38K соответственно.

10 5. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-4, в котором CH1- и CL-участки двух плечей содержат аминокислотные замены на аминокислотном остатке, соответствующем аминокислотному положению в SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20 для CH1 и в SEQ ID NO: 21 или 22 для CL, где аминокислотные замены в CH1- и CL-участках выбирают из:

- 15 (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
(2) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
(3) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или
(4) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;
где X выбрано из S, A или G.

20 6. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD47, предпочтительно человеческим CD47, а второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с ТАА, который
25 экспрессируется на той же клетке, что и CD47, предпочтительно человеческим ТАА.

30 7. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, в котором второй антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CLDN18.2, который экспрессируется на той же клетке, что и CD47, предпочтительно человеческим CLDN18.2.

8. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6 или п. 7, в котором анти-CD47 антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- 5 (1) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 29 соответственно;
 (2) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 29 соответственно;
 (3) SEQ ID NO: 1, 27, 2 и 30 соответственно;
 (4) SEQ ID NO: 1, 28, 2 и 30 соответственно;
 (5) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 33 соответственно;
- 10 (6) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 33 соответственно;
 (7) SEQ ID NO: 1, 31, 2 и 34 соответственно;
 (8) SEQ ID NO: 1, 32, 2 и 34 соответственно;
 (9) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 37 соответственно;
 (10) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 37 соответственно;
- 15 (11) SEQ ID NO: 1, 35, 2 и 38 соответственно;
 (12) SEQ ID NO: 1, 36, 2 и 38 соответственно;
 (13) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 41 соответственно;
 (14) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 41 соответственно;
 (15) SEQ ID NO: 1, 39, 2 и 42 соответственно;
- 20 (16) SEQ ID NO: 1, 40, 2 и 42 соответственно;
 (17) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 45 соответственно;
 (18) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 45 соответственно;
 (19) SEQ ID NO: 1, 43, 2 и 46 соответственно;
 (20) SEQ ID NO: 1, 44, 2 и 46 соответственно;
- 25 (21) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 49 соответственно;
 (22) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 49 соответственно;
 (23) SEQ ID NO: 1, 47, 2 и 50 соответственно;
 (24) SEQ ID NO: 1, 48, 2 и 50 соответственно;
 (25) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 53 соответственно;
- 30 (26) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 53 соответственно;
 (27) SEQ ID NO: 1, 51, 2 и 54 соответственно;
 (28) SEQ ID NO: 1, 52, 2 и 54 соответственно;
 (29) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 57 соответственно;

- (30) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 57 соответственно;
- (31) SEQ ID NO: 1, 55, 2 и 58 соответственно;
- (32) SEQ ID NO: 1, 56, 2 и 58 соответственно;
- (33) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 29 соответственно;
- 5 (34) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 29 соответственно;
- (35) SEQ ID NO: 23, 27, 24 и 30 соответственно;
- (36) SEQ ID NO: 23, 28, 24 и 30 соответственно;
- (37) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 33 соответственно;
- (38) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 33 соответственно;
- 10 (39) SEQ ID NO: 25, 31, 26 и 34 соответственно;
- (40) SEQ ID NO: 25, 32, 26 и 34 соответственно;
- (41) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 37 соответственно;
- (42) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 37 соответственно;
- (43) SEQ ID NO: 23, 35, 24 и 38 соответственно;
- 15 (44) SEQ ID NO: 23, 36, 24 и 38 соответственно;
- (45) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 41 соответственно;
- (46) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 41 соответственно;
- (47) SEQ ID NO: 25, 39, 26 и 42 соответственно;
- (48) SEQ ID NO: 25, 40, 26 и 42 соответственно;
- 20 (49) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 45 соответственно;
- (50) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 45 соответственно;
- (51) SEQ ID NO: 23, 43, 24 и 46 соответственно;
- (52) SEQ ID NO: 23, 44, 24 и 46 соответственно;
- (53) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 49 соответственно;
- 25 (54) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 49 соответственно;
- (55) SEQ ID NO: 25, 47, 26 и 50 соответственно;
- (56) SEQ ID NO: 25, 48, 26 и 50 соответственно;
- (57) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 53 соответственно;
- (58) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 53 соответственно;
- 30 (59) SEQ ID NO: 23, 51, 24 и 54 соответственно;
- (60) SEQ ID NO: 23, 52, 24 и 54 соответственно;
- (61) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 57 соответственно;
- (62) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 57 соответственно;

(63) SEQ ID NO: 25, 55, 26 и 58 соответственно; или

(64) SEQ ID NO: 25, 56, 26 и 58 соответственно.

5 9. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, а второй антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 1, 28, 2, 29, 3, 63, 4 и 64 соответственно;

(2) SEQ ID NO: 1, 36, 2, 37, 3, 67, 4 и 68 соответственно;

10 (3) SEQ ID NO: 1, 44, 2, 45, 3, 71, 4 и 72 соответственно;

(4) SEQ ID NO: 1, 52, 2, 53, 3, 73, 4 и 74 соответственно;

(5) SEQ ID NO: 1, 31, 2, 34, 3, 65, 4 и 66 соответственно;

(6) SEQ ID NO: 1, 39, 2, 42, 3, 69, 4 и 70 соответственно;

(7) SEQ ID NO: 1, 47, 2, 50, 3, 75, 4 и 76 соответственно;

15 (8) SEQ ID NO: 1, 55, 2, 58, 3, 77, 4 и 78 соответственно;

(9) SEQ ID NO: 23, 28, 24, 29, 59, 63, 60 и 64 соответственно;

(10) SEQ ID NO: 23, 36, 24, 37, 59, 67, 60 и 68 соответственно;

(11) SEQ ID NO: 23, 44, 24, 45, 59, 71, 60 и 72 соответственно;

(12) SEQ ID NO: 23, 52, 24, 53, 59, 73, 60 и 74 соответственно;

20 (13) SEQ ID NO: 25, 31, 26, 34, 61, 65, 62 и 66 соответственно;

(14) SEQ ID NO: 25, 39, 26, 42, 61, 69, 62 и 70 соответственно;

(15) SEQ ID NO: 25, 47, 26, 50, 61, 75, 62 и 76 соответственно; или

(16) SEQ ID NO: 25, 55, 26, 58, 61, 77, 62 и 78 соответственно.

25 10. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5, где выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит плечо, содержащее антитело к модулятору иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент, и обладает способностью специфически связываться с ICM.

30

11. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, где ICM выбирают из группы, которая состоит из CD3, CD16, CD27, CD28, CD40, CD122, NKp46, OX40, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1,

LAG-3, TIM-3, VISTA, SIGLEC7, SIGLEC9, KIR, BTLA, B7-H3 и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

5 12. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5 и 10-11, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3, предпочтительно человеческим CD3, и содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно.

10 13. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-5 и 10-12, в котором первый антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3, предпочтительно человеческим CD3, а второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3.

15 14. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен
20 содержит VH, CH1, VL и CL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16 соответственно.

25 15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенные биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по одному из п.п. 1-14.

16. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 15.

17. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 16.

30 18. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ таргетирования DLL3, который экспрессируется на поверхности раковой клетки у субъекта, который нуждается в этом, путем привлечения Т-клеток, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 18.

5

20. Способ таргетирования одного или двух антигенов, которые экспрессируются на поверхности раковой клетки, у субъекта, который нуждается в этом, с использованием индуцируемой блокадой CD47 активации опосредуемого макрофагами фагоцитоза или опосредуемой CD3 активации Т-клеток, и/или лечения рака у субъекта, который нуждается в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, которая содержит выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель, где необязательно рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелолейкоза (CLL), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

10

15

20

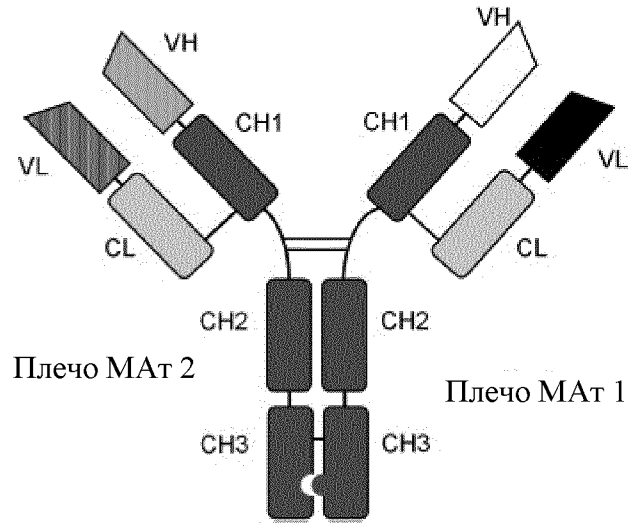
25

30

21. Способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из п.п. 1-14, включающий культивирование клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, пригодных для получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

22. Способ получения фармацевтической композиции, которая содержит биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по одному из п.п. 1-14 , включающий объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

5



Фиг. 1

Участок	CHI																							
EU-номер	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G	T	A	A
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A

Участок	CHI																							
EU-номер	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
IgG1	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG2	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG3	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG4	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S

Участок	CHI																							
EU-номер	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
IgG1	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
IgG2	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P*
IgG3	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S*	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
IgG4	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P

Участок	CHI																							
EU-номер	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
IgG1	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG2	S	S	N*	F*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG3	S	S	S*	L*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG4	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K

Участок	CHI								
EU-номер	214	215	216	217	218			219	220
IgG1	K*	V	E	P	K			S	C
IgG2	T	V	E	R	K			C	C
IgG3	R	V	E	L	K	T	P	L	G
IgG4	R	V	E	S	K	Y	G		

Фиг. 2

Участок	CL																							
EU-номер	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
Каппа	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S
Лямбда	Q	P	K	A	A*	P	S*	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T

Участок	CL																							
EU-номер	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153		154
Каппа	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A*		L
Лямбда	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D	S*	S	P	V

Участок	CL																							
EU-номер	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178
Каппа	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T
Лямбда	K	A	G			V	E	T*	T	T	P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y

Участок	CL																							
EU-номер	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202
Каппа	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V*	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S
Лямбда	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	R*	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G		

Участок	CL												
EU-номер	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	
Каппа	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
Лямбда	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C	

Фиг. 2Б

Участок	FR1																							
Номер по Кэботу	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Анти-CD47 VH	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A
Анти-CLDN18.2 VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A

Участок	FR1	CDR1											FR2													
Номер по Кэботу	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
Анти-CD47 VH	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I		
Анти-CLDN18.2 VH	S	G	F	I	F	S	S	F	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V		

Участок	FR2		CDR2										FR3																	
Номер по Кэботу	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71						
Анти-CD47 VH	G	N	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	V						
Анти-CLDN18.2 VH	A	Y	I	S	S	G	R	S	T	M	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R						

Участок	FR3																							
Номер по Кэботу	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Анти-CD47 VH	D	K	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C
Анти-CLDN18.2 VH	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	T	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C

Участок	CDR3												FR4										
Номер по Кэботу	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
Анти-CD47 VH	A	G	T	D	L						A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
Анти-CLDN18.2 VH	A	R	G	G	F	Y	G	N	S	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Фиг. 2В

Участок	FR1																							
Номер по Кэботу	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Анти-CD47 VL	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	H
Анти-CLDN18.2 VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K

Участок	FR1			CDR1										FR2										
Номер по Кэботу	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Анти-CD47 VL	A	S	Q							N	I	N	V	W	L	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q
Анти-CLDN18.2 VL	S	S	L	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	T	W	Y	Q	Q	K	P	G	K

Участок	FR2							CDR2					FR3														
Номер по Кэботу	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66			
Анти-CD47 VL	A	P	R	L	L	I	Y	K	A	S	N	L	H	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G			
Анти-CLDN18.2 VL	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G			

Участок	FR3																								CDR3	
Номер по Кэботу	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90		
Номер по Кэботу	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q		
Анти-CLDN18.2 VL	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	S	C	Q	N		

Участок	CDR3							FR4																		
Номер по Кэботу	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107									
Номер по Кэботу	G	Q	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K									
Анти-CLDN18.2 VL	A	Y	S	Y	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K									

Фиг. 2Г

Участок	FR1																							
Номер по Кэботу	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Анти-CD3 VH	D	I	K	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	T
Анти-DLL3 VH	E	V	R	L	S	Q	S	G	G	Q	M	K	K	P	G	E	S	M	R	L	S	C	R	A

Участок	FR1	CDR1												FR2												
Номер по Кэботу	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
Анти-CD3 VH	S	G	Y	T	F	T	R	Y	T	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I		
Анти-DLL3 VH	S	G	Y	T	F	T	S	Y	V	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	R	R	P	E	W	I		

Участок	FR2	CDR2										FR3												
Номер по Кэботу	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Анти-CD3 VH	G	Y	I	N	P	S	R	G	Y	T	N	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	T
Анти-DLL3 VH	G	Y	I	N	P	Y	N	D	A	T	K	Y	A	R	K	F	Q	G	R	A	T	L	T	S

Участок	FR3																							
Номер по Кэботу	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Анти-CD3 VH	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C
Анти-DLL3 VH	D	K	Y	S	D	T	A	F	L	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C

Участок	CDR3												FR4										
Номер по Кэботу	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
Анти-CD3 VH	A	R	Y	Y	D	D	H	Y	S	L	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
Анти-DLL3 VH	A	R	G	G	Y	D	Y	D	G		D	Y	W	G	R	G	A	P	V	T	V	S	S

Фиг. 2Д

Участок	FR1																							
Номер по Кэботу	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Анти-CD3 VL	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	R
Анти-DLL3 VL	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	H

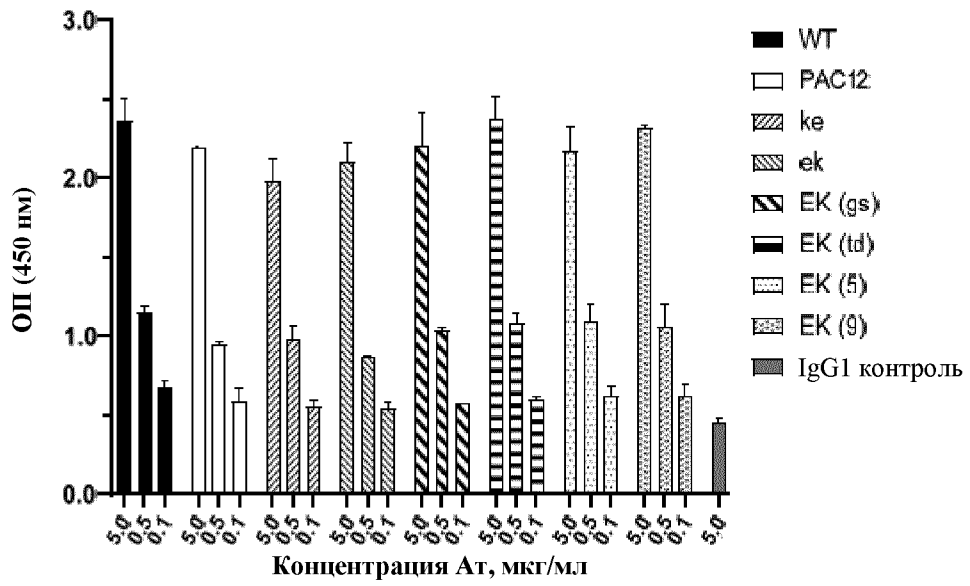
Участок	FR1	CDR1						FR2																
Номер по Кэботу	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Анти-CD3 VH	A	S	S		S	V	S	Y	M	N	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P	K	R	W	I
Анти-DLL3 VL	A	S	Q	N	I	N	V	W	L	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I

Участок	FR2	CDR2				FR3																		
Номер по Кэботу	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Анти-CD3 VH	Y	D	T	S	K	V	A	S	G	V	P	Y	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S
Анти-DLL3 VL	Y	K	A	S	N	L	H	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T

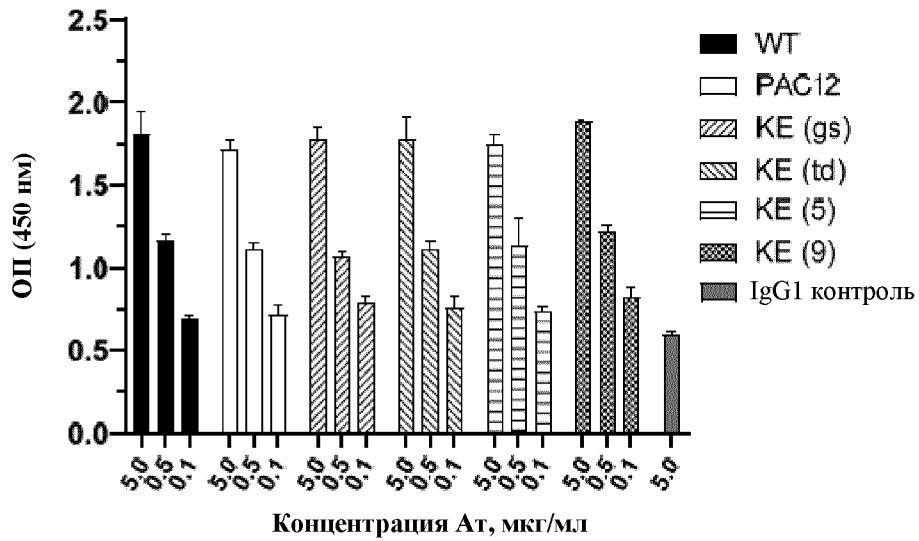
Участок	FR3																	CDR3							
Номер по Кэботу	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	
Анти-CD3 VH	L	T	I	S	S	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	L	
Анти-DLL3 VL	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	G	Q	S	Y	P	F	

Участок	CDR3	FR4									
Номер по Кэботу	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
Анти-CD3 VH	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K
Анти-DLL3 VL	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K

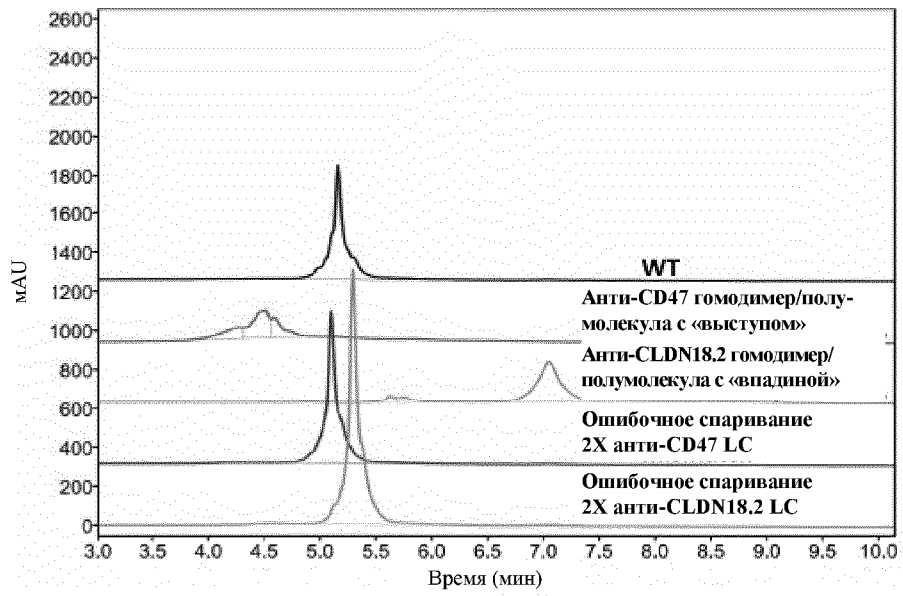
Фиг. 2E



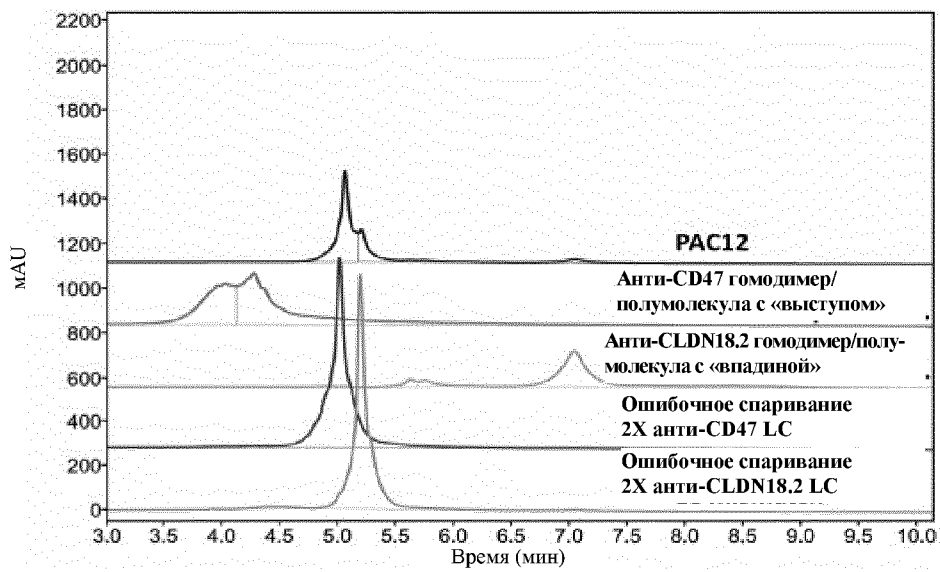
Фиг. 3А



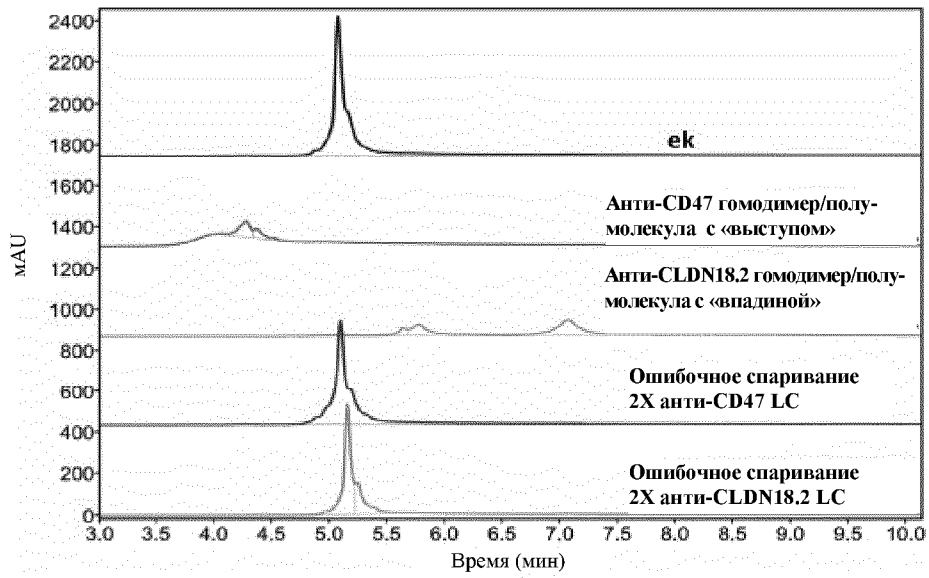
Фиг. 3Б



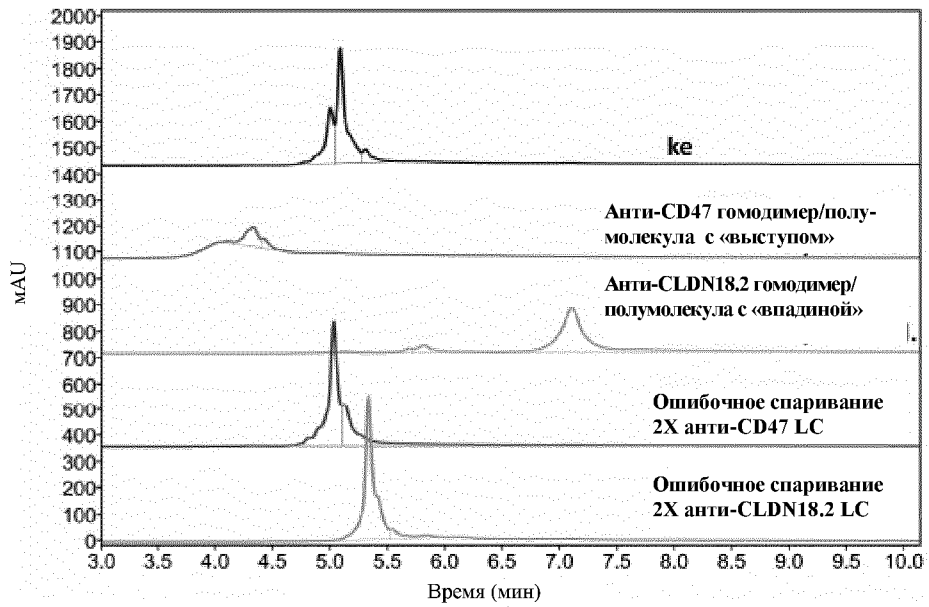
Фиг. 3В



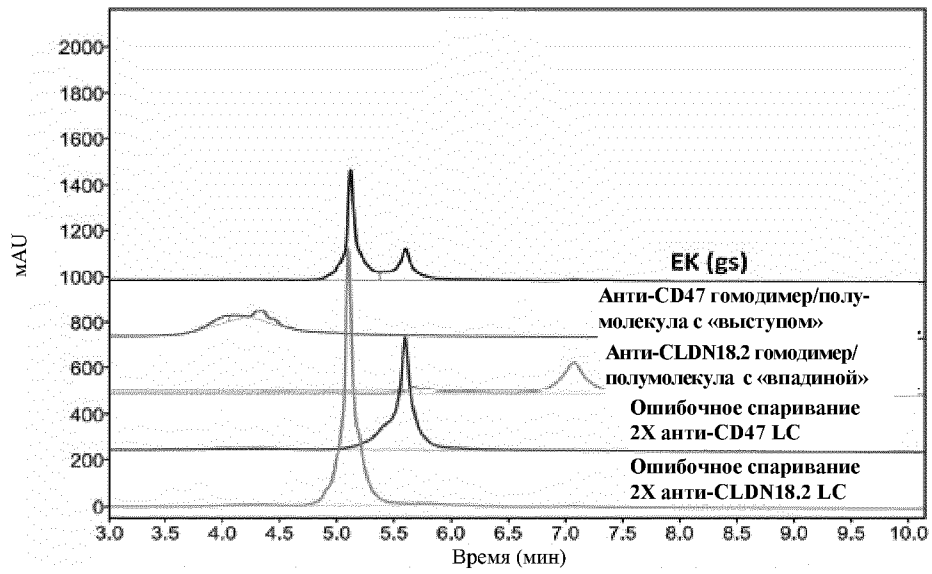
Фиг. 3Г



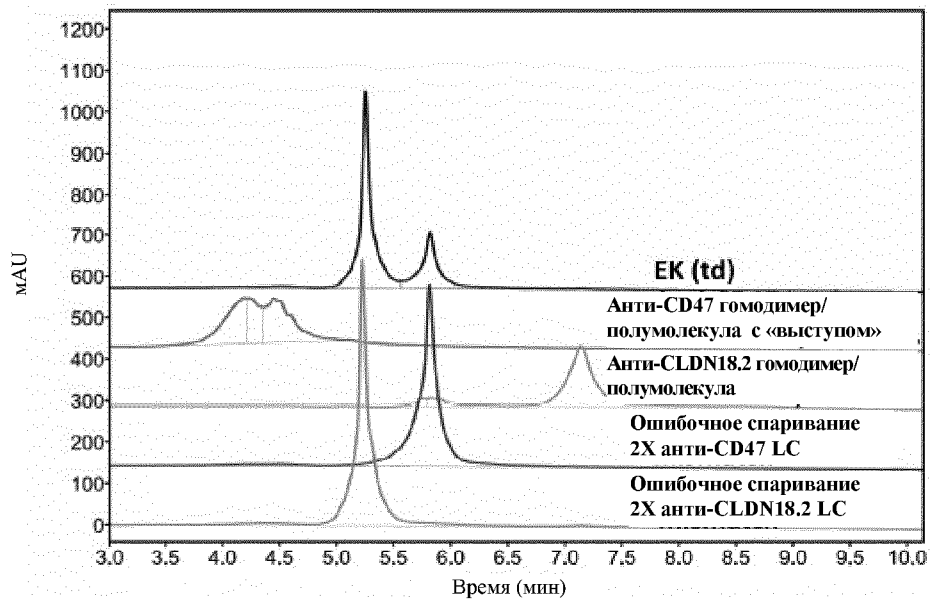
Фиг. 3Д



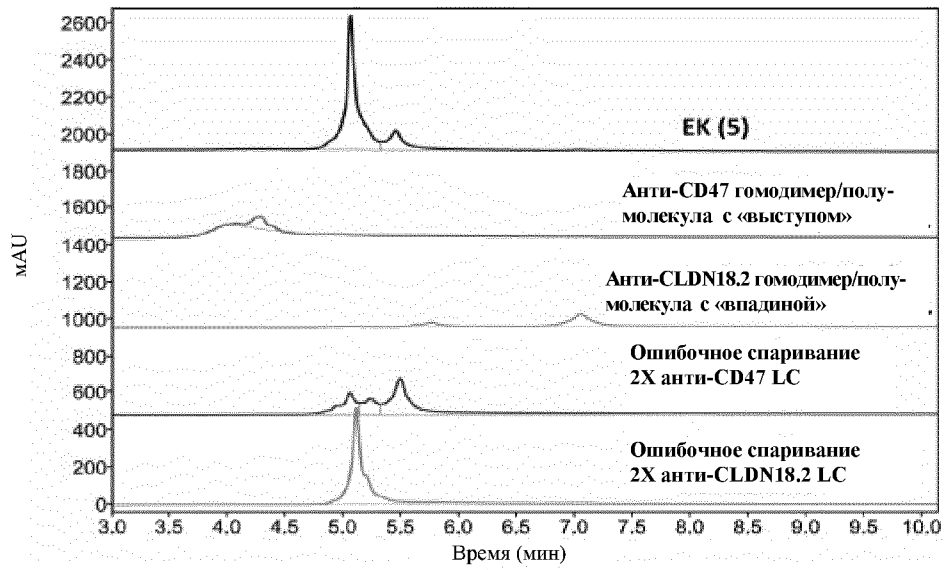
Фиг. 3Е



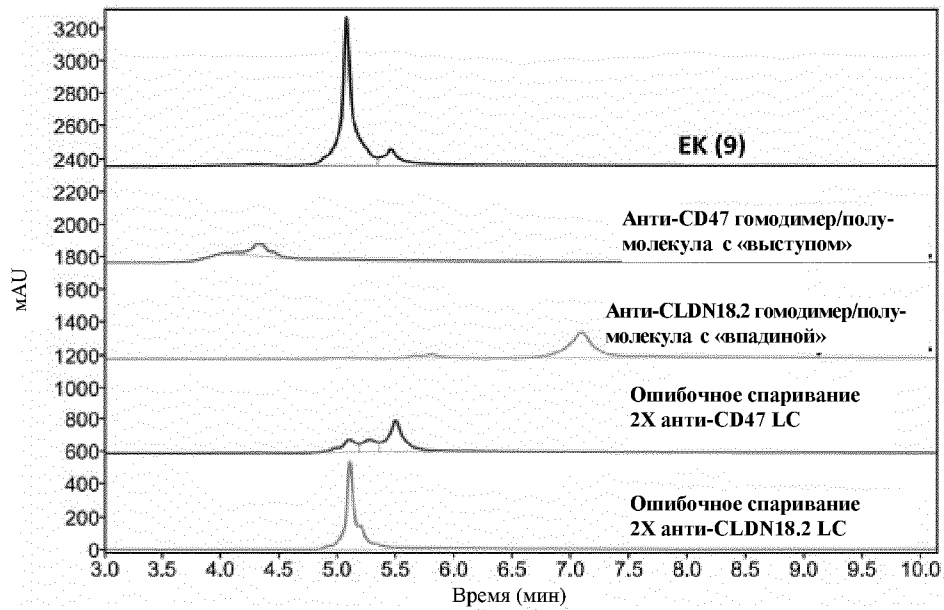
Фиг. 3Ж



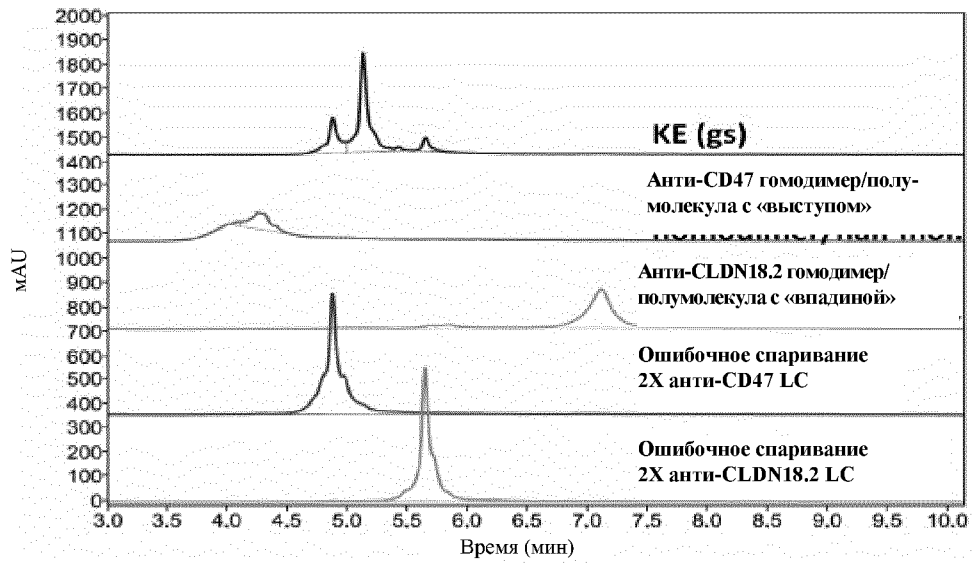
Фиг. 33



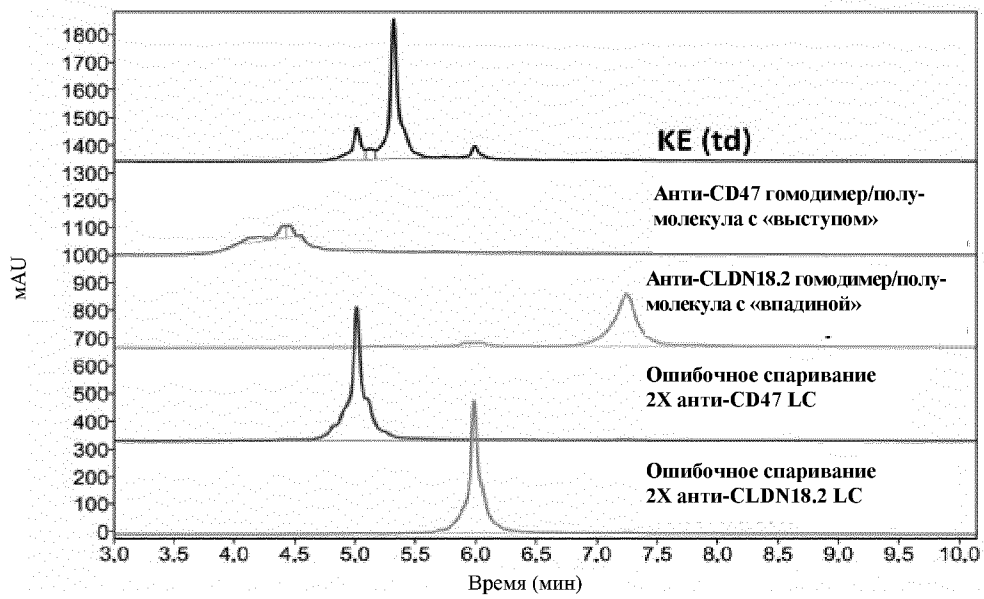
Фиг. 3И



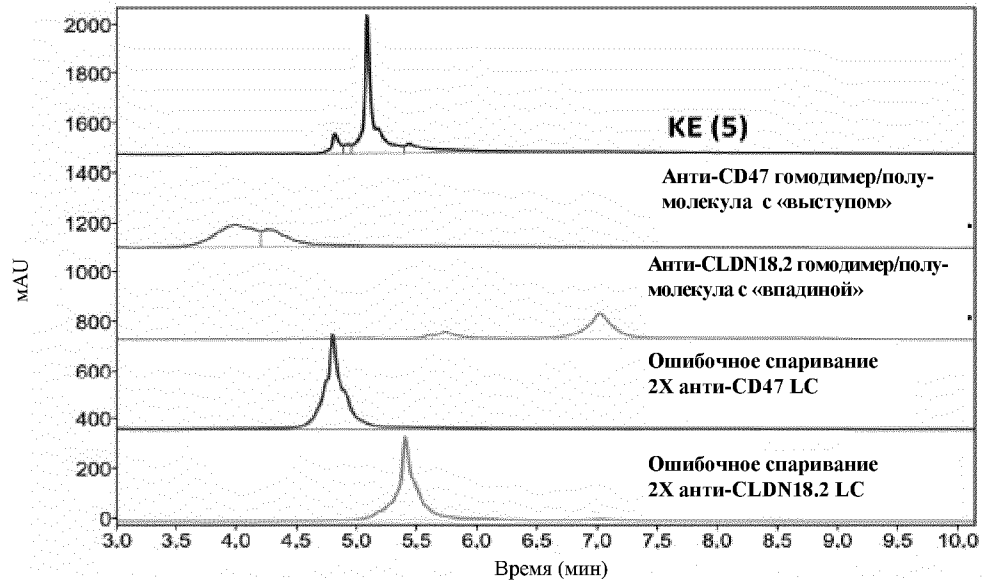
Фиг. 3К



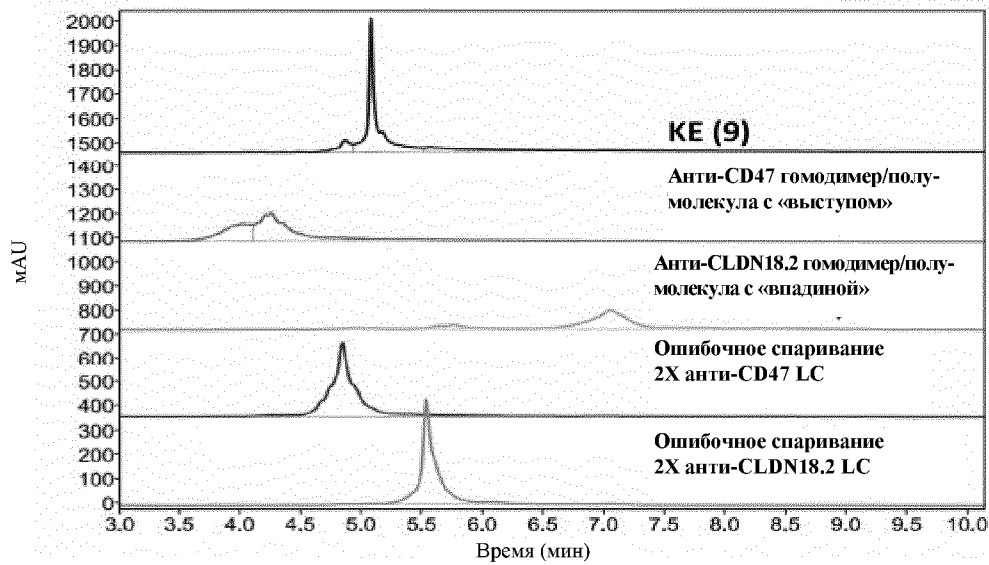
Фиг. 3Л



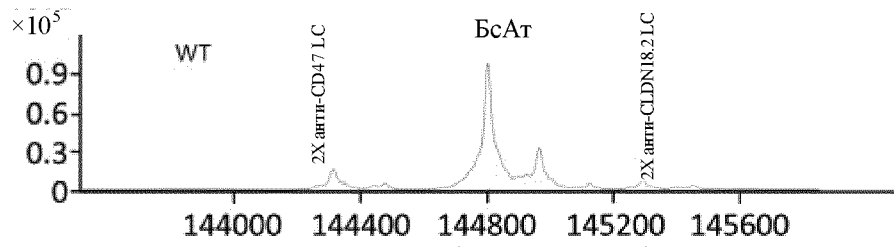
Фиг. 3М



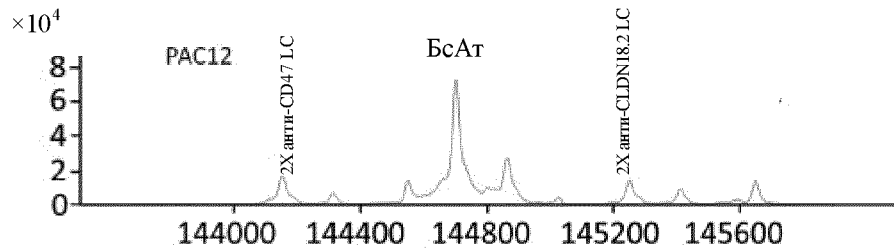
Фиг. 3Н



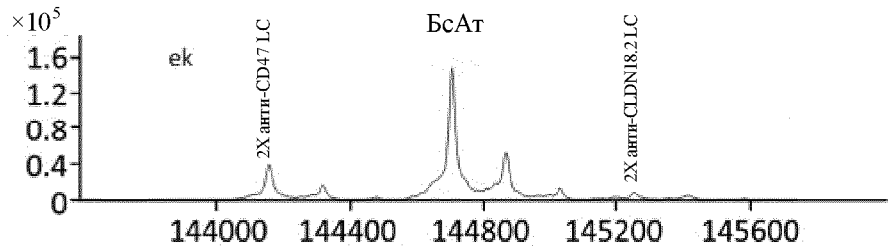
Фиг. 3О



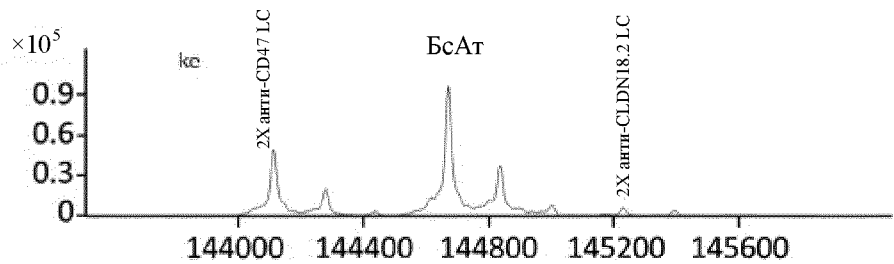
Интенсивность сигнала в зависимости от массы после деконволюции



Интенсивность сигнала в зависимости от массы после деконволюции

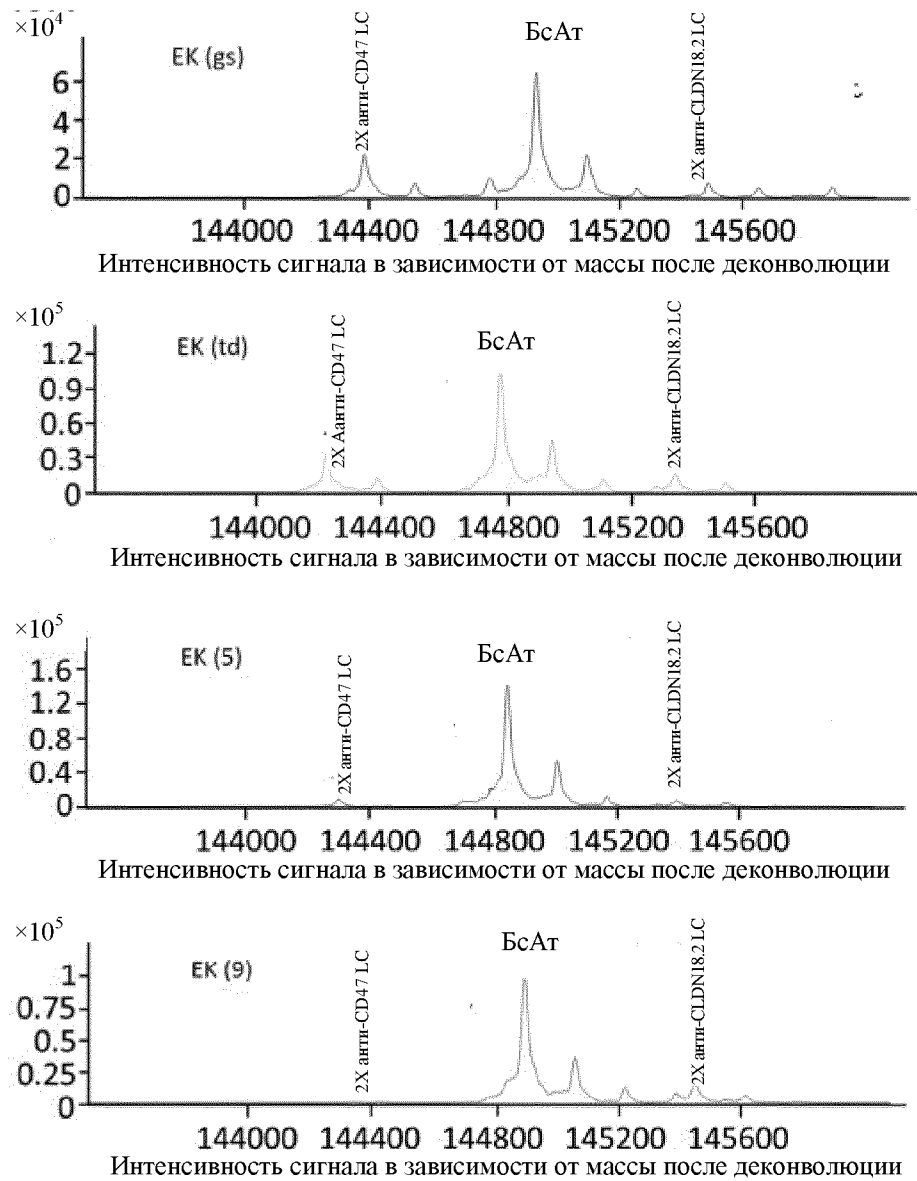


Интенсивность сигнала в зависимости от массы после деконволюции

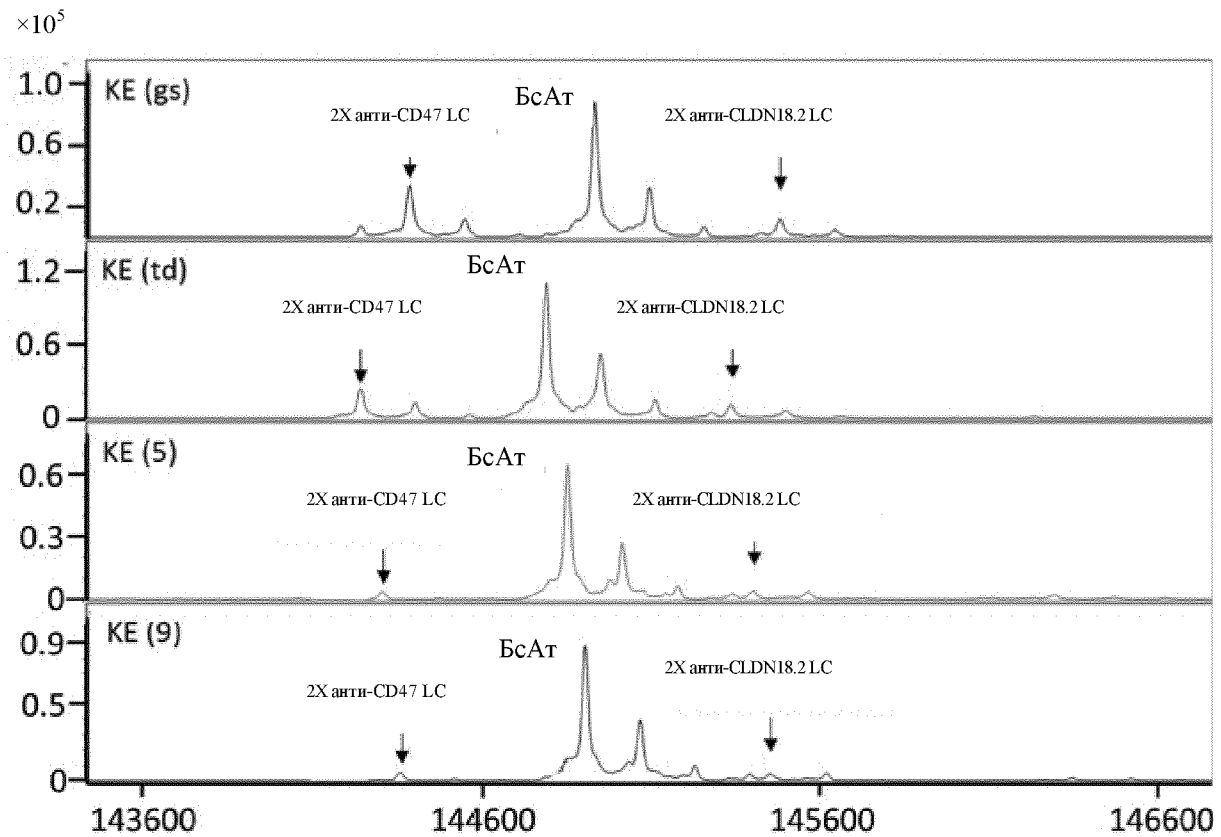


Интенсивность сигнала в зависимости от массы после деконволюции

Фиг. 3П

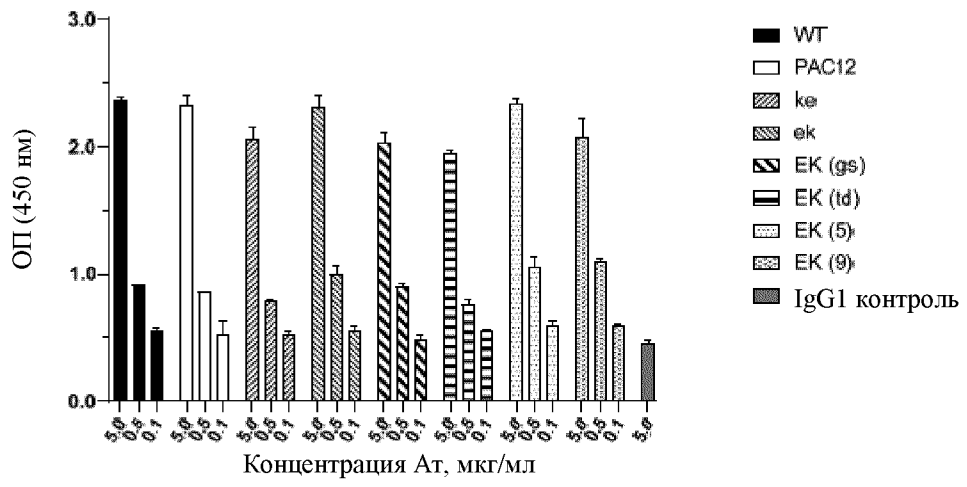


Фиг. 3Р

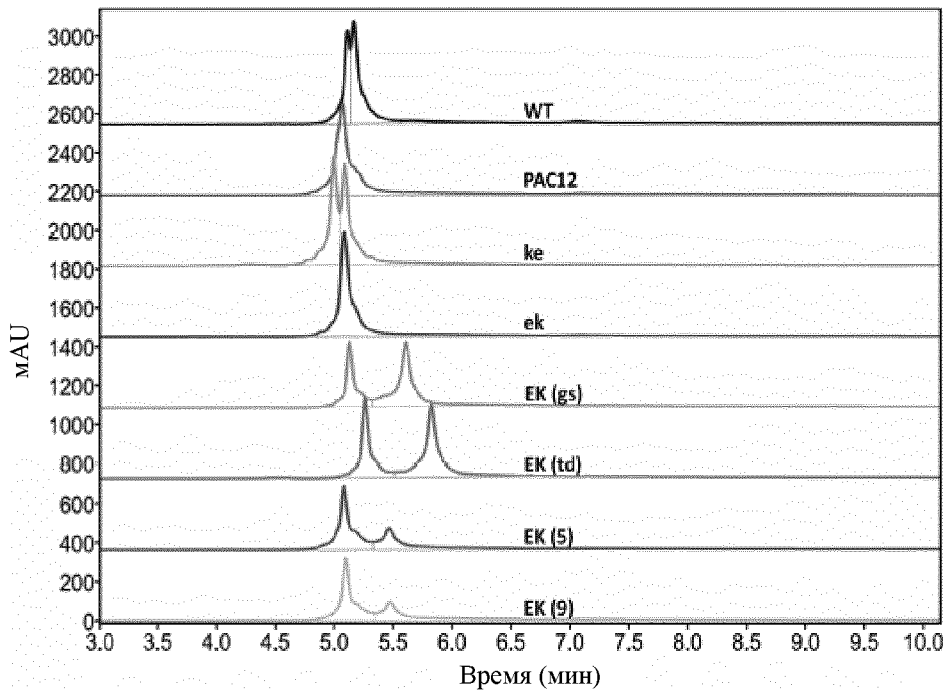


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.)
после деконволюции

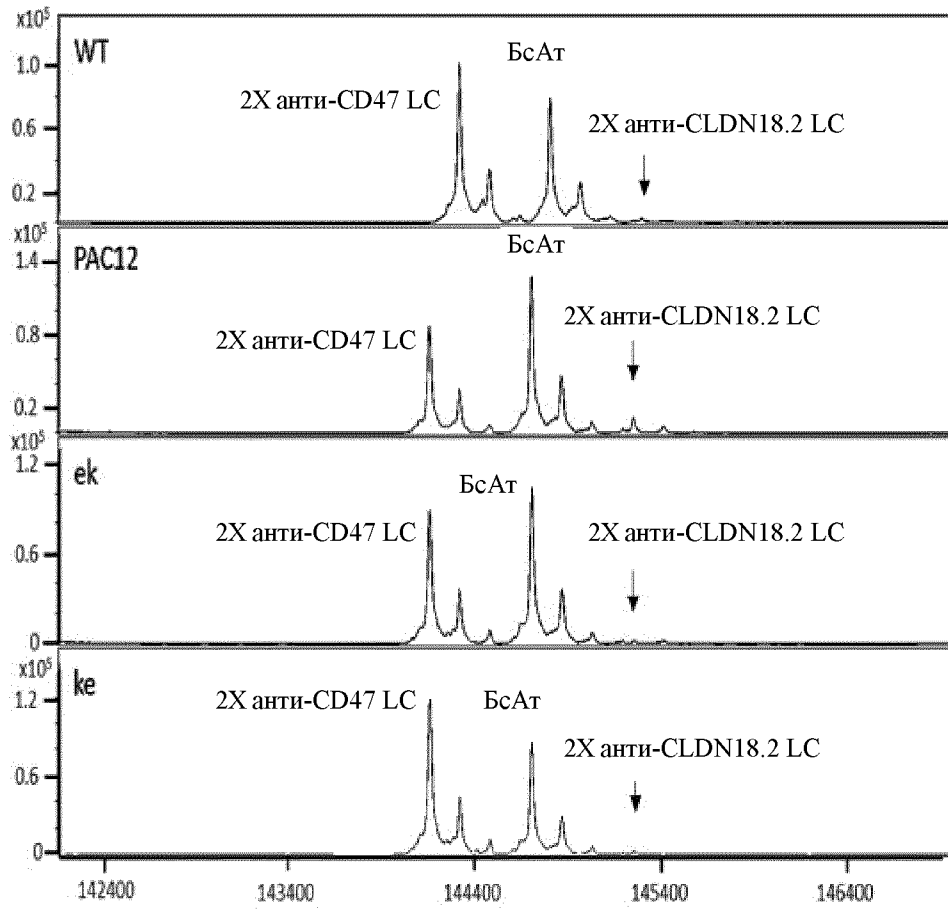
Фиг. 3С



Фиг. 4А

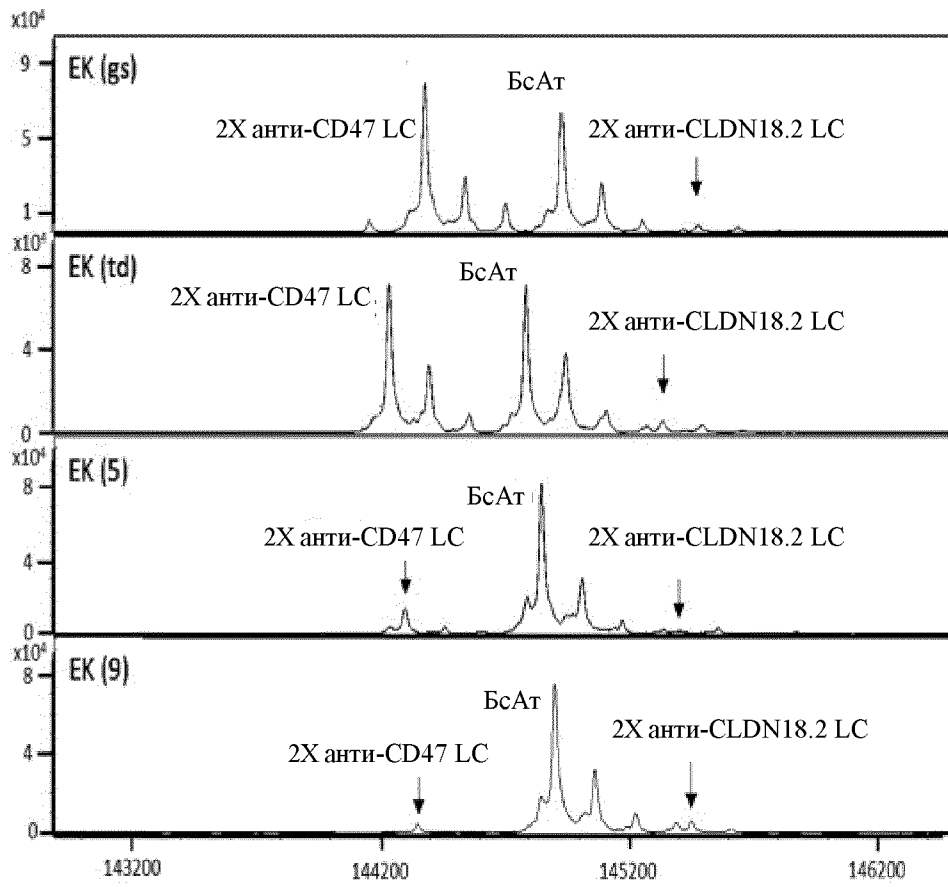


Фиг. 4Б



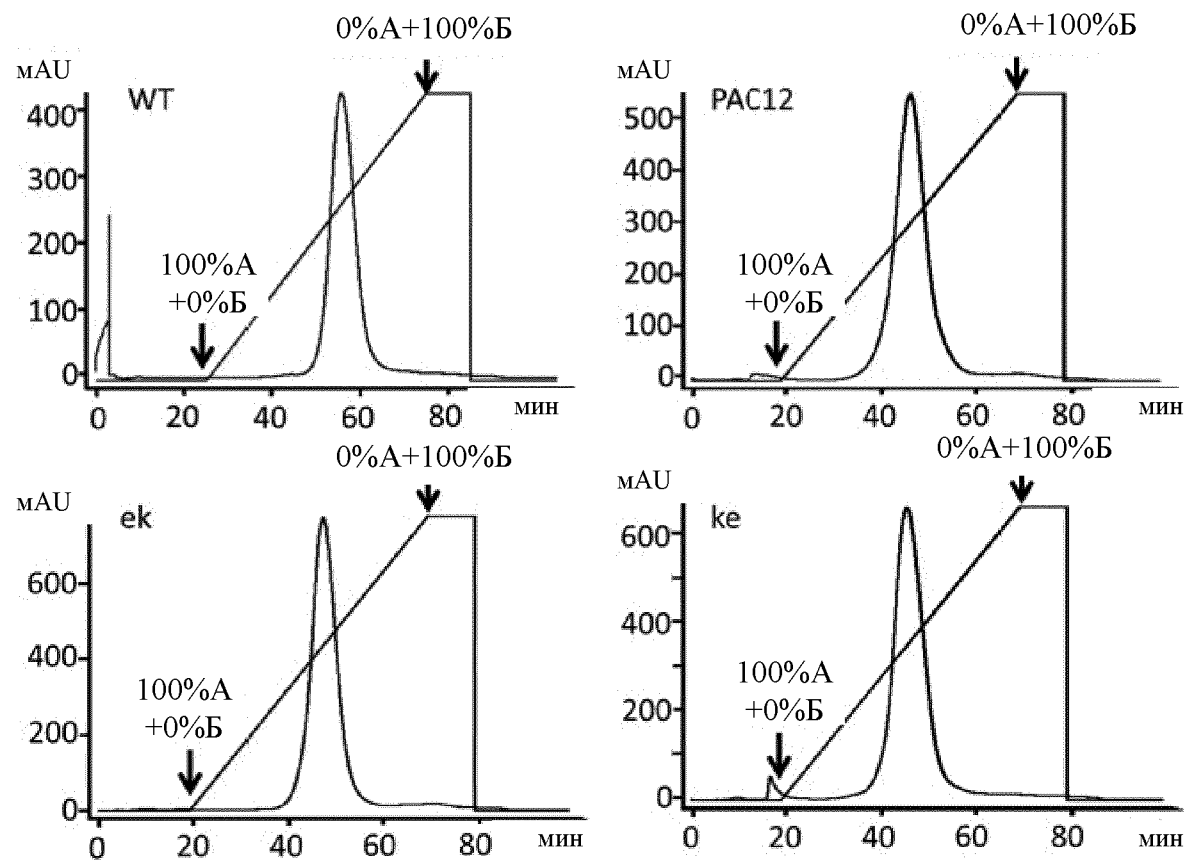
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 4В

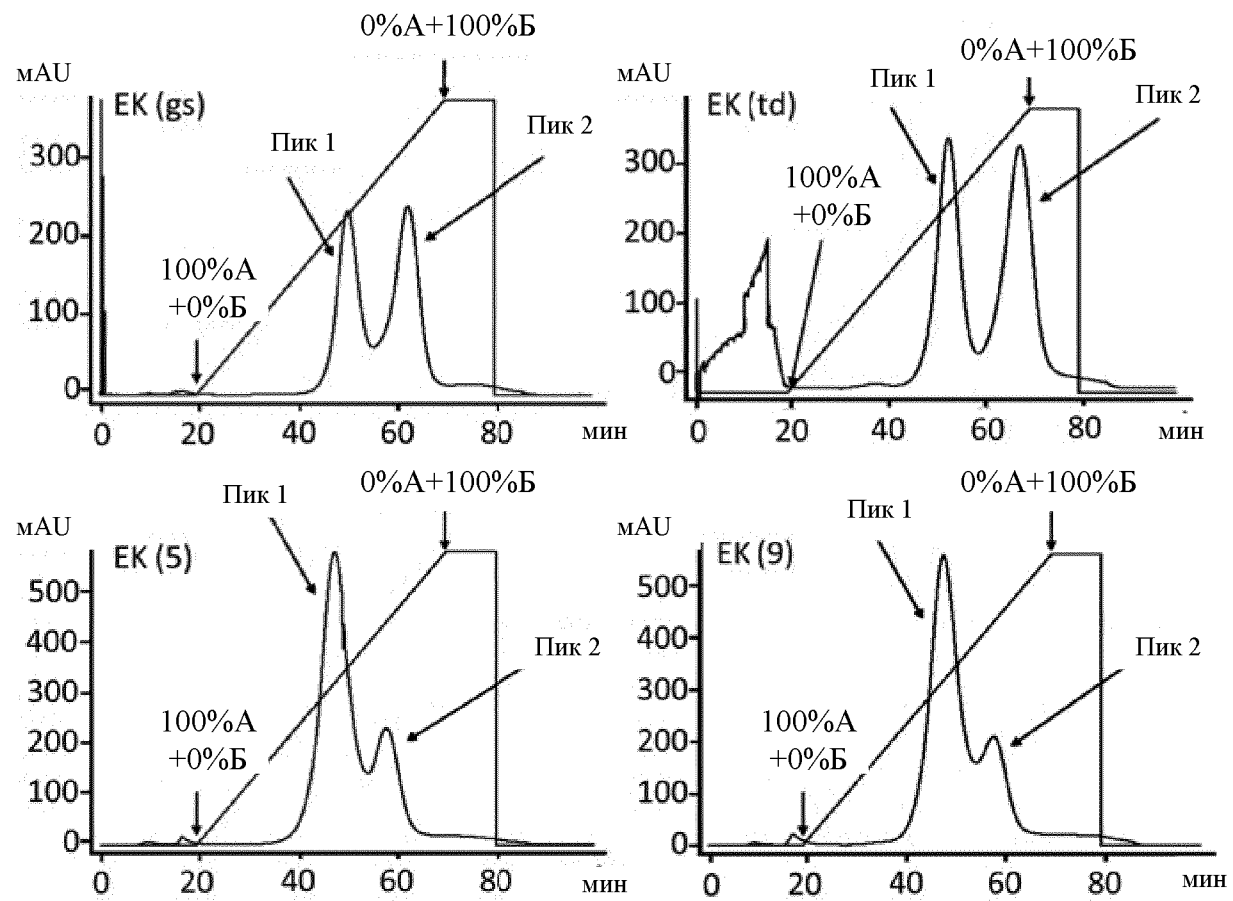


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

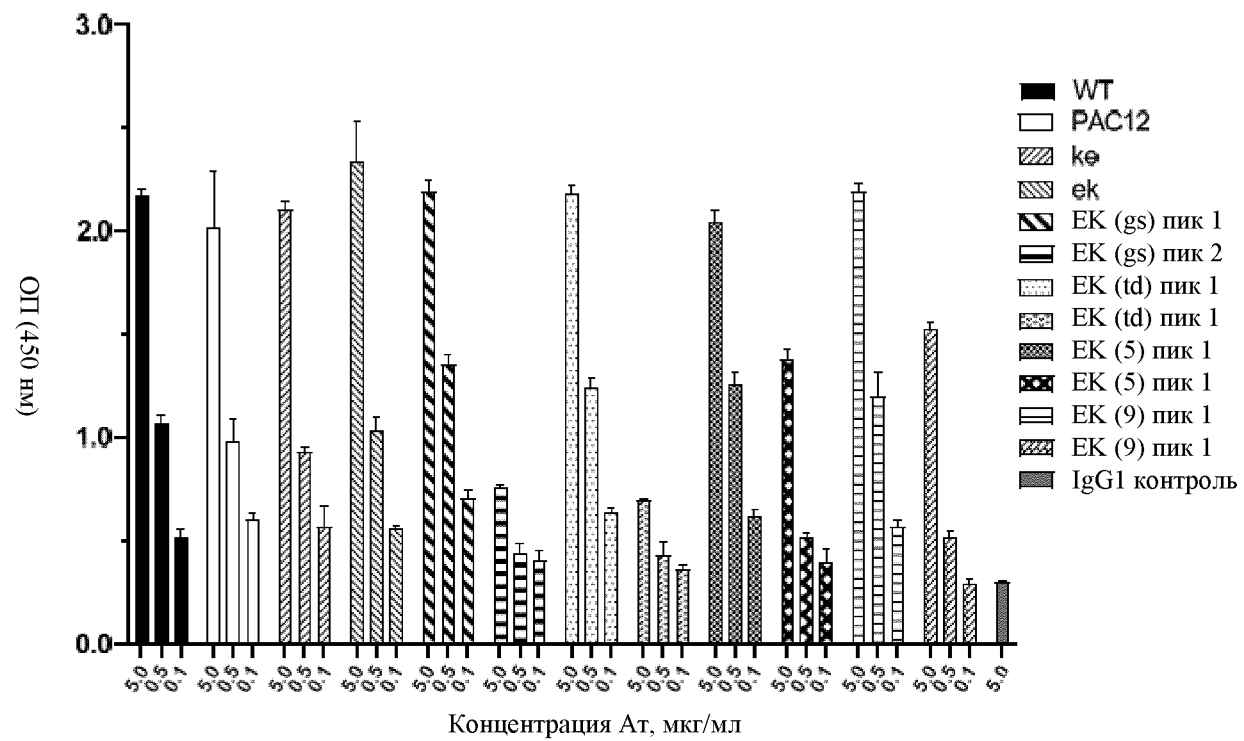
Фиг. 4Г



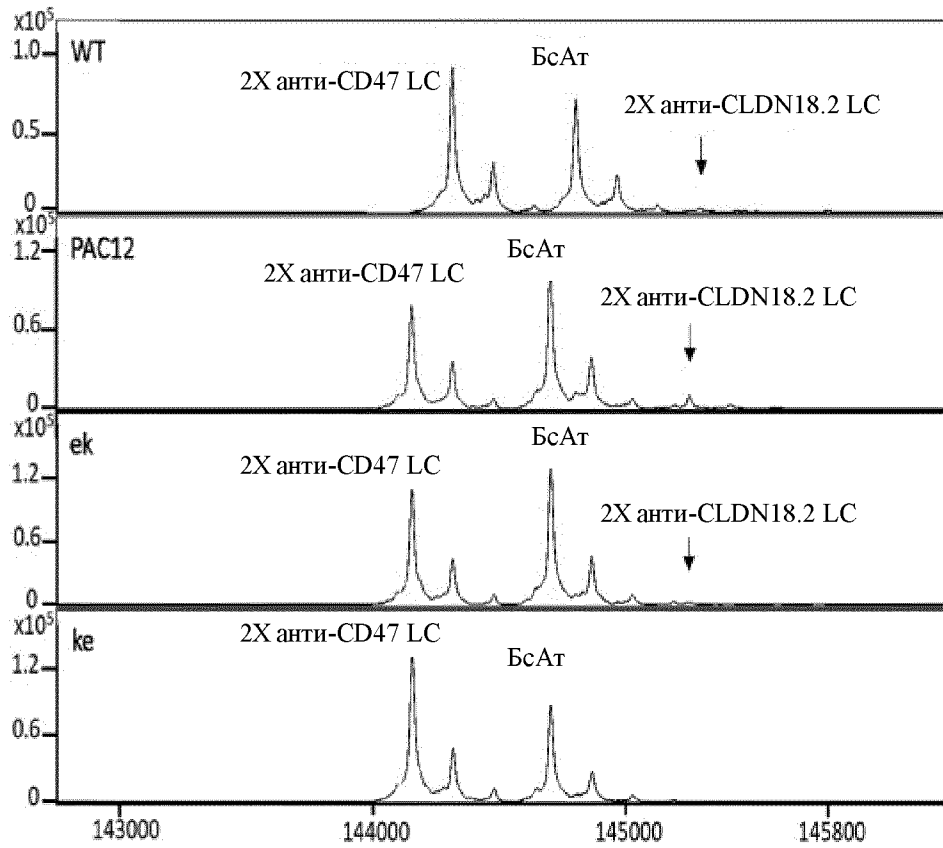
Фиг. 4Д



Фиг. 4Е

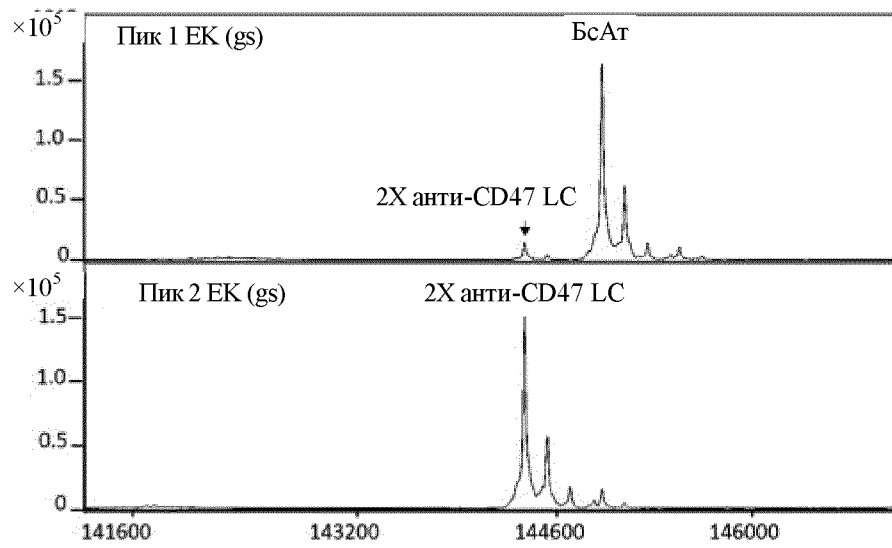


Фиг. 4Ж



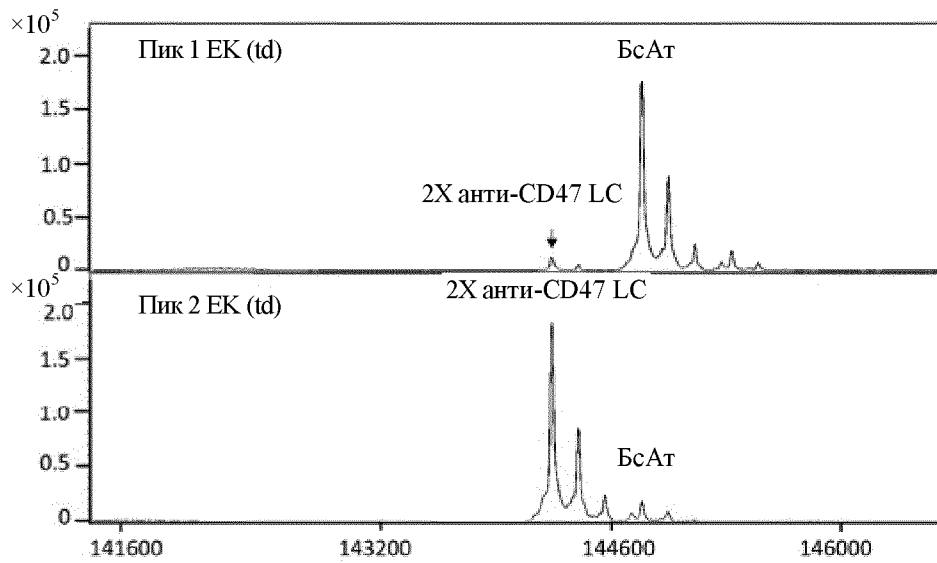
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 43



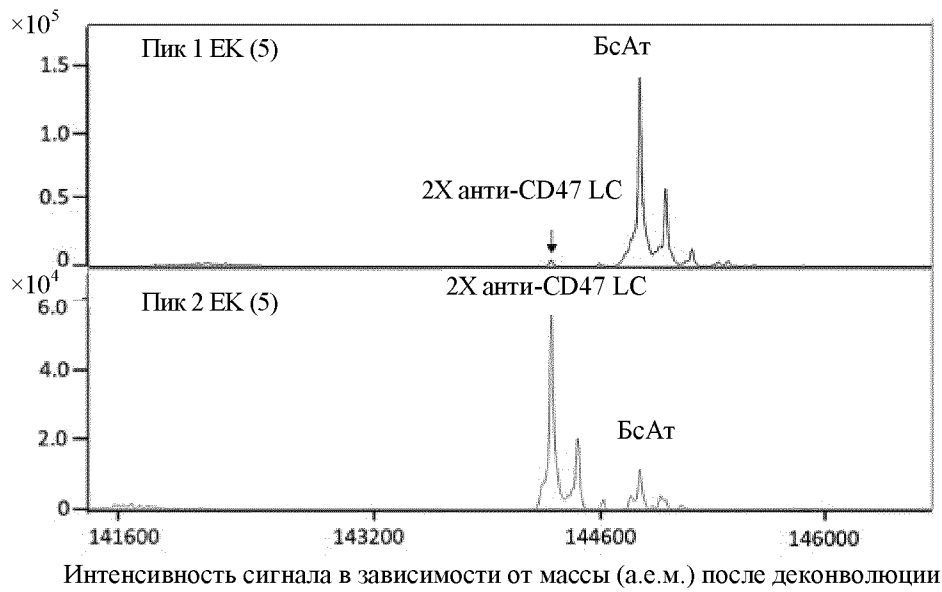
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 4И

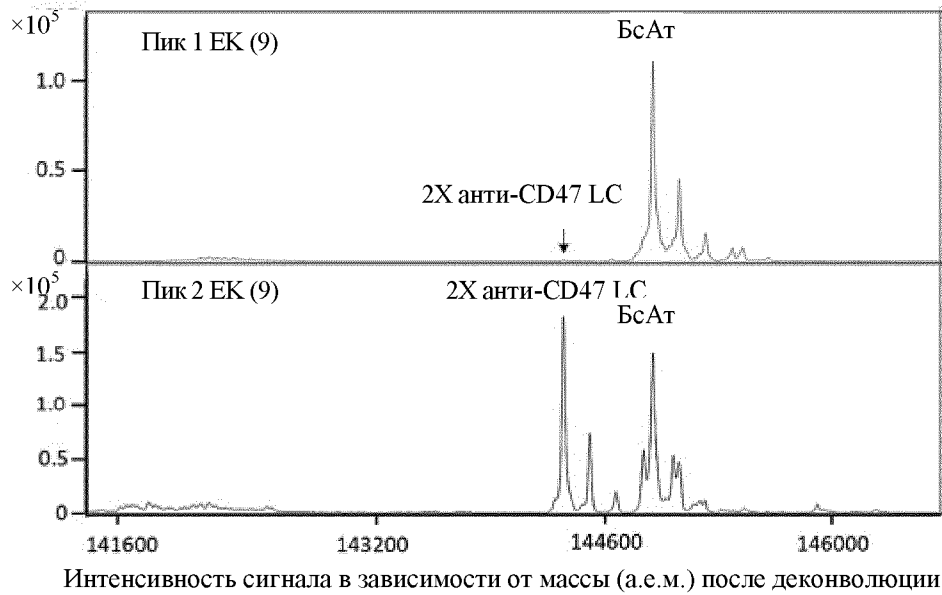


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

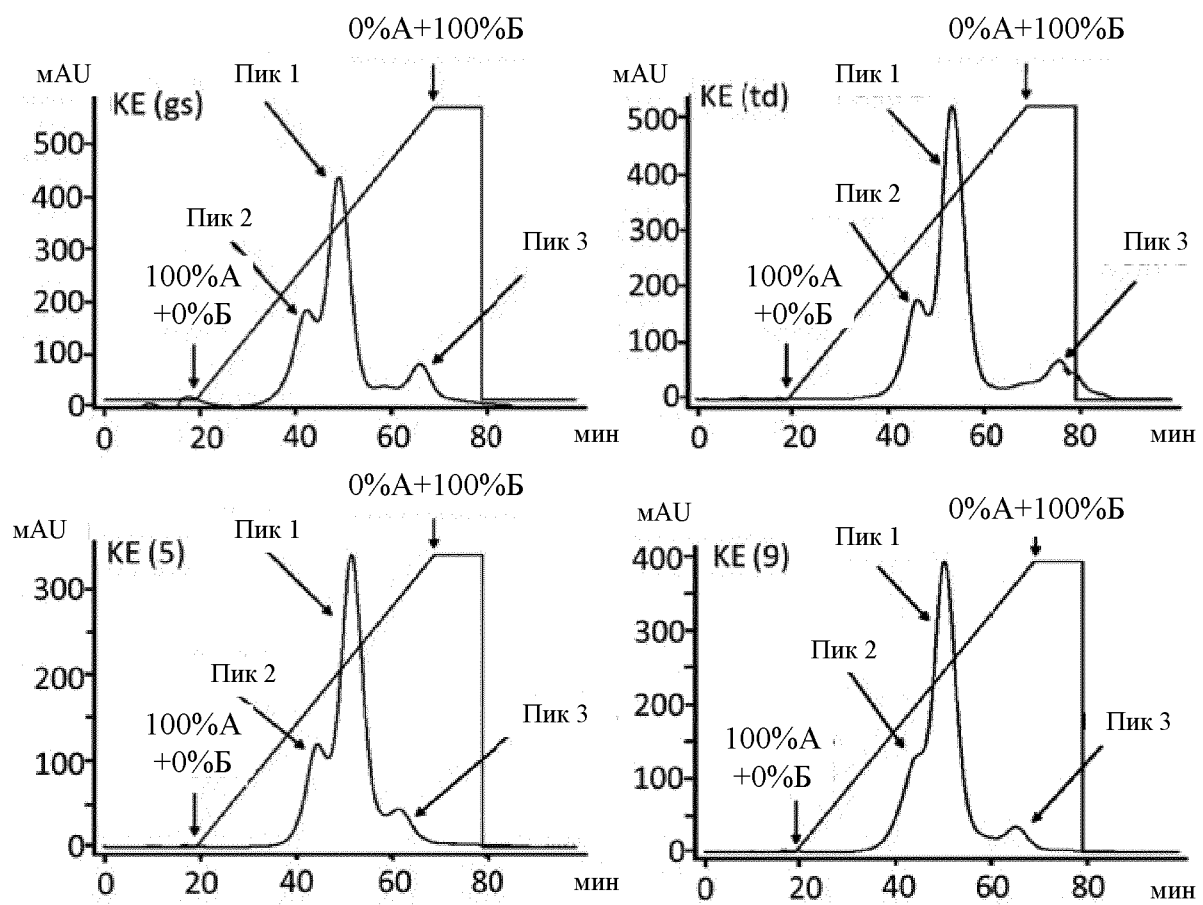
Фиг. 4К



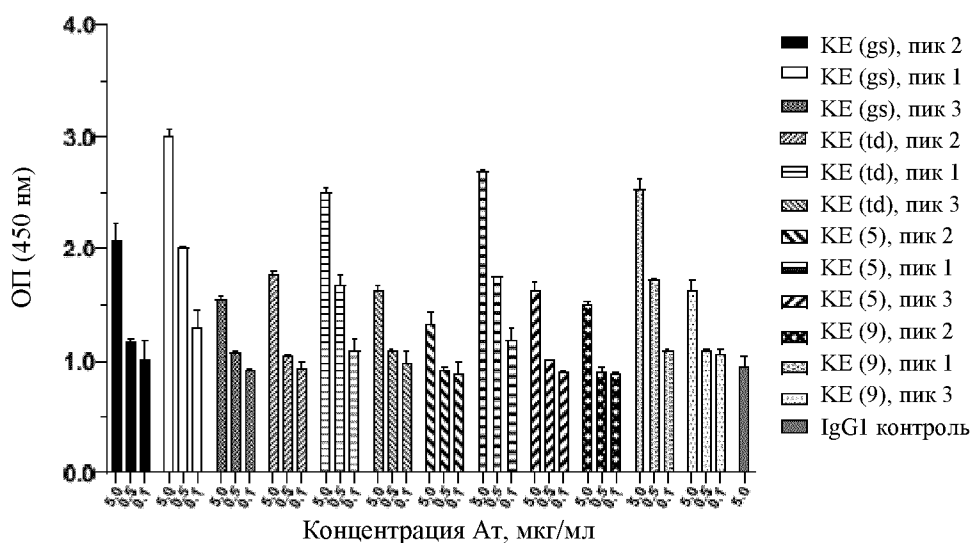
Фиг. 4J



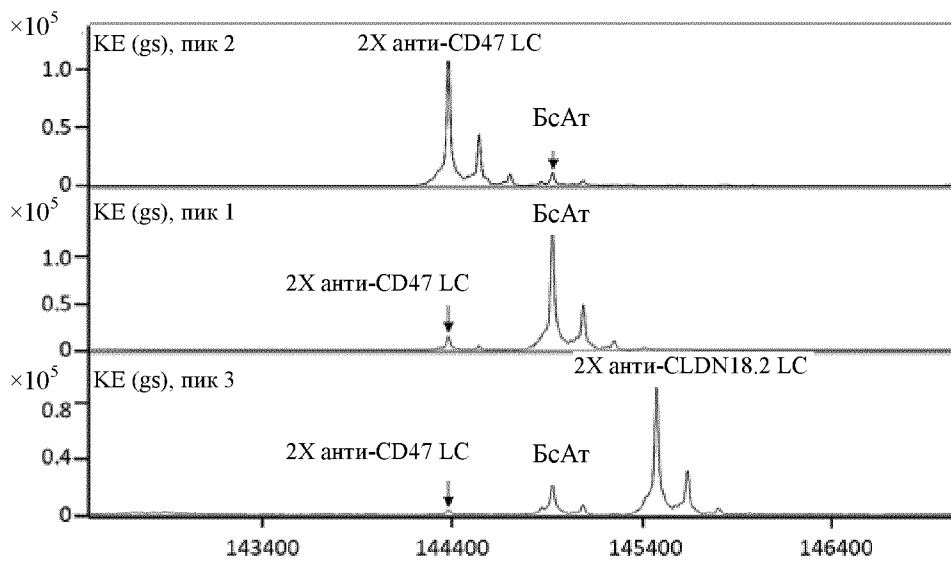
Фиг. 4M



Фиг. 5А

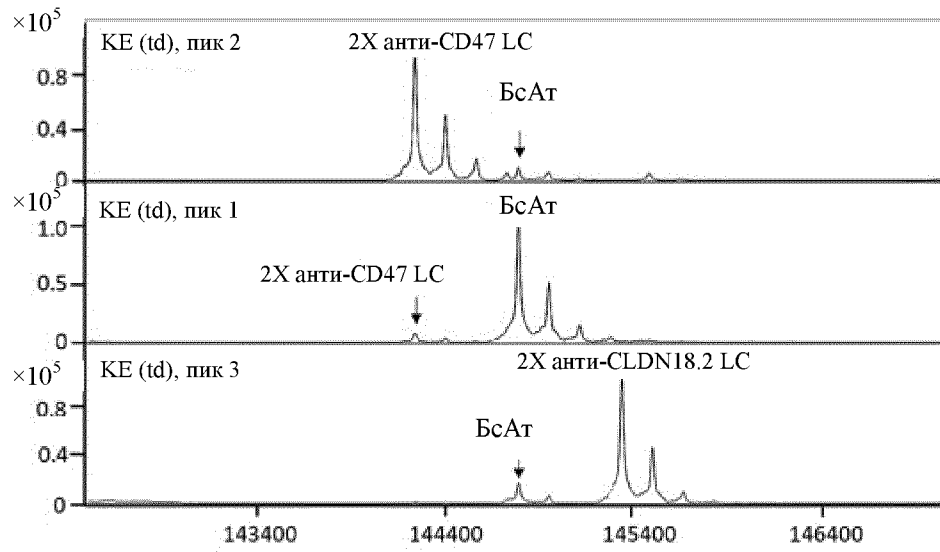


Фиг. 5Б



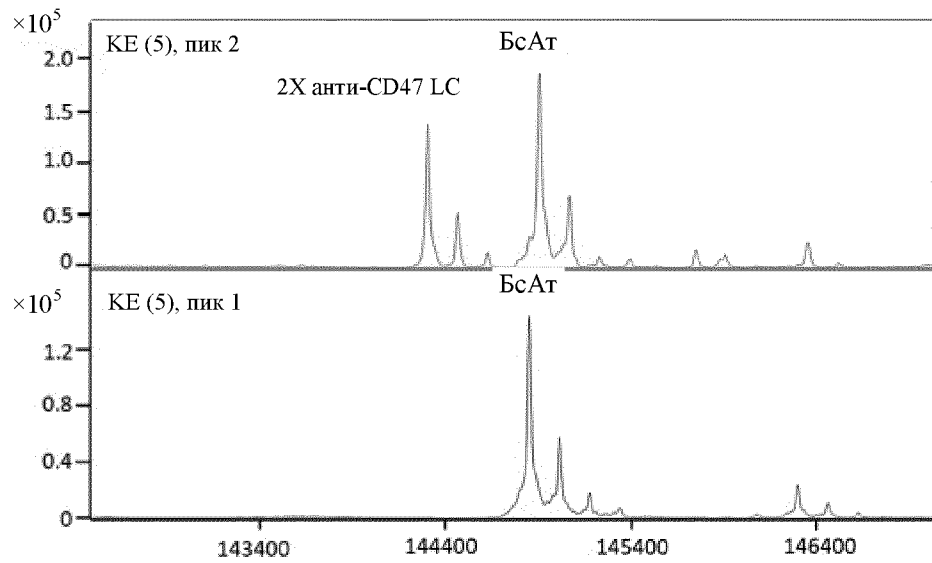
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 5В



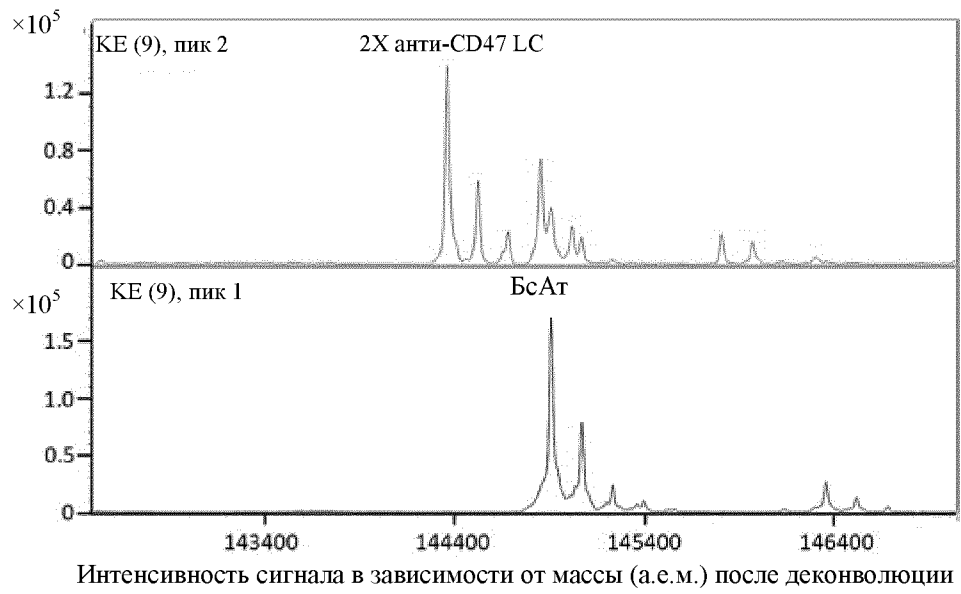
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 5Г

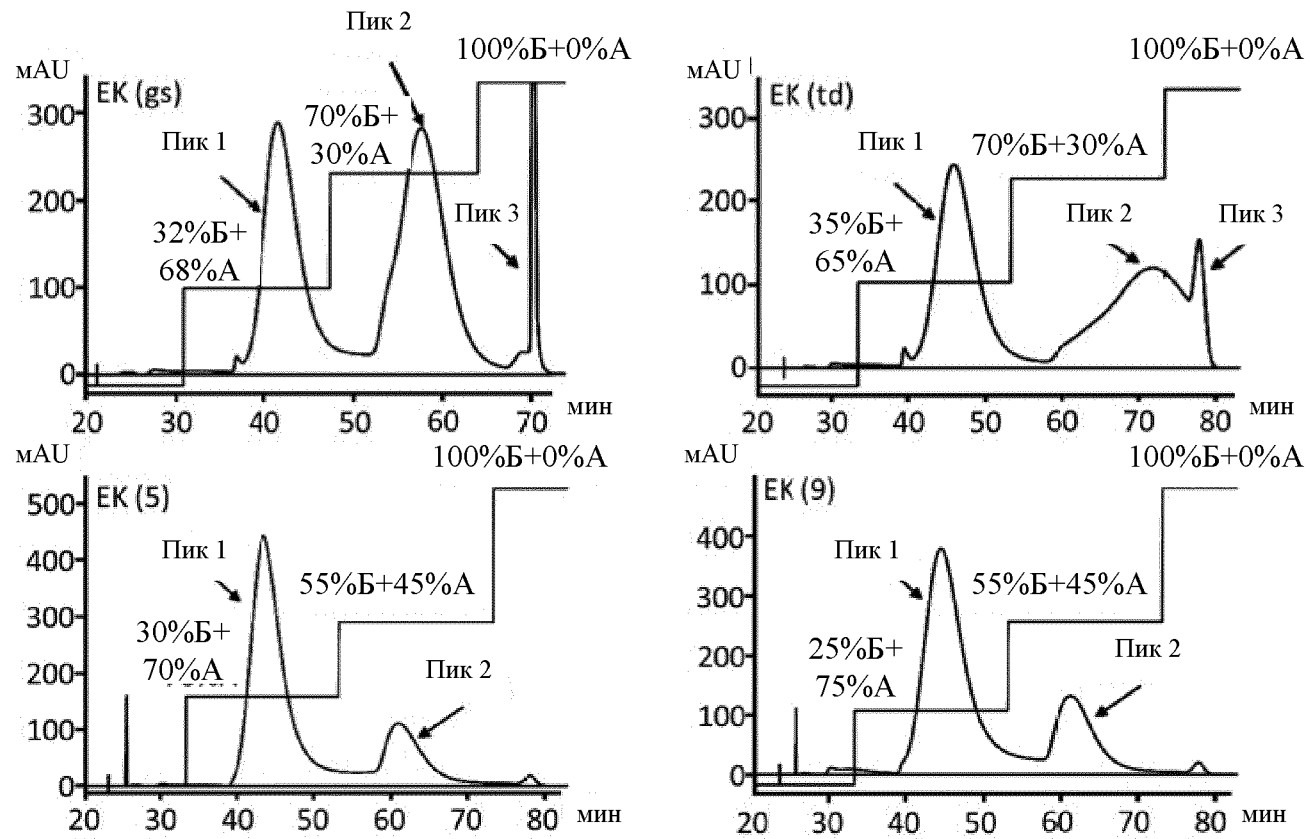


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

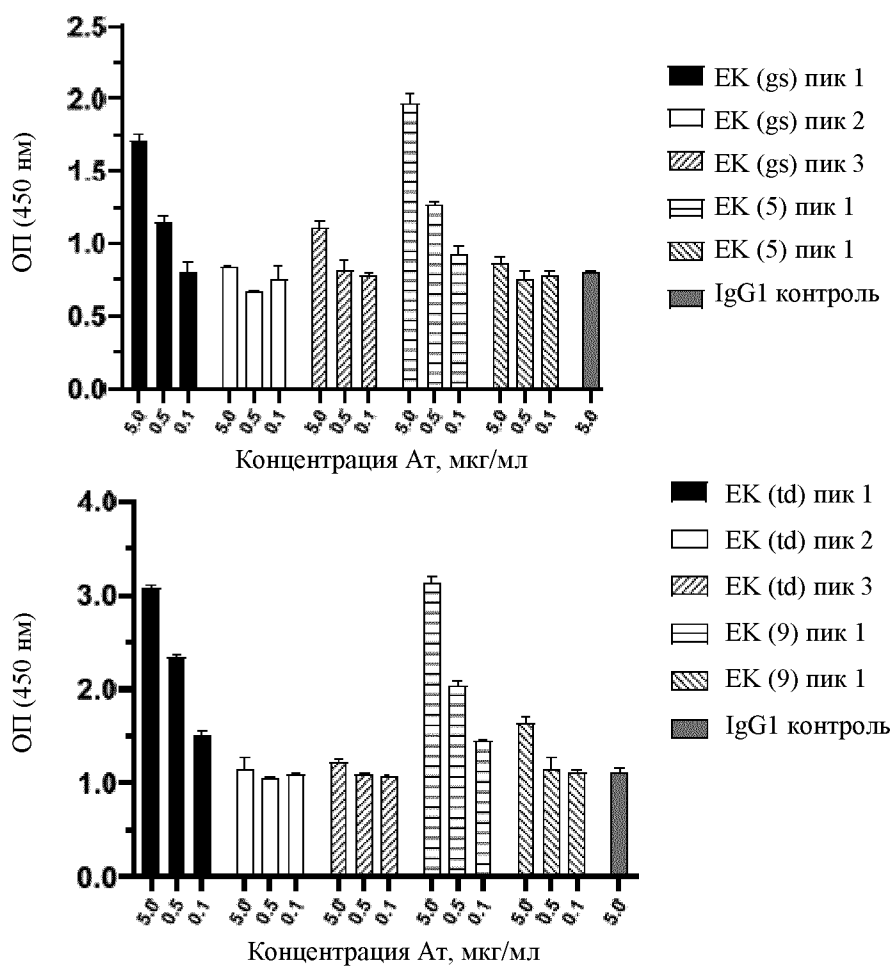
Фиг. 5Д



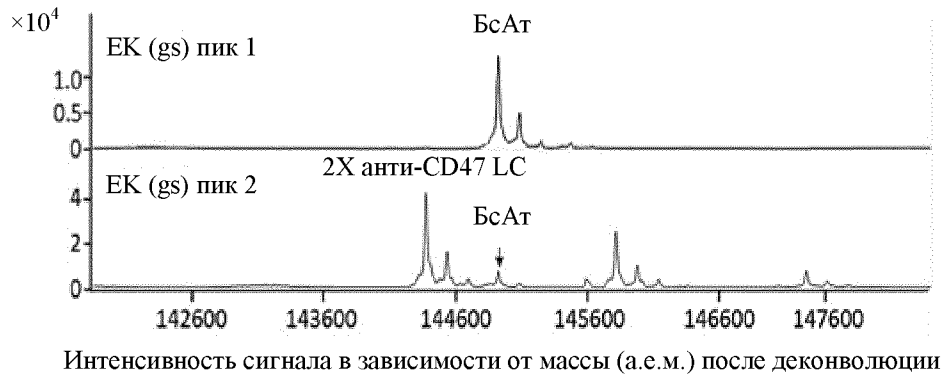
Фиг. 5Е



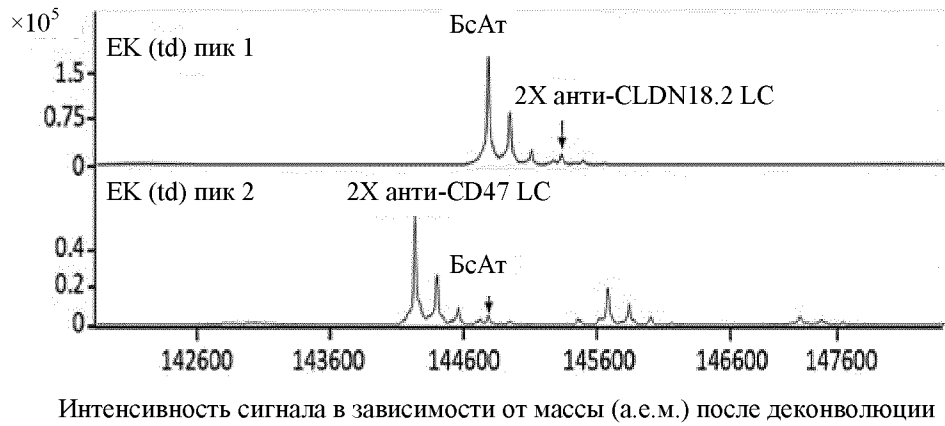
Фиг. 6А



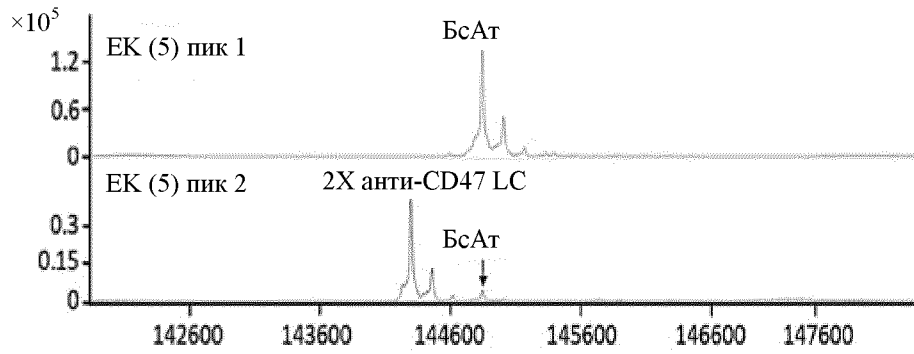
Фиг. 6Б



Фиг. 6В

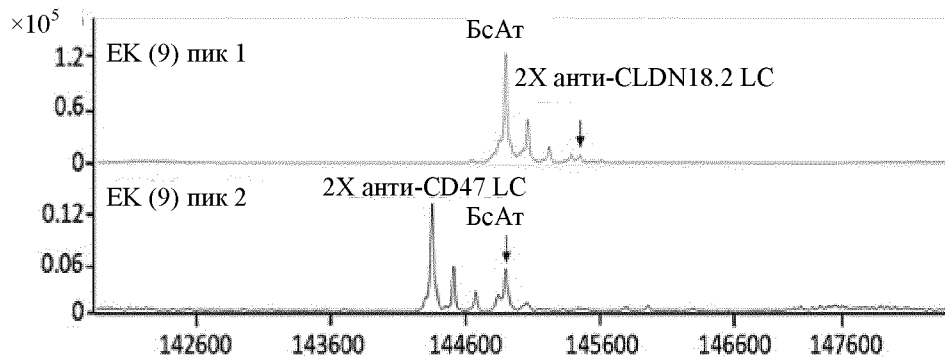


Фиг. 6Г



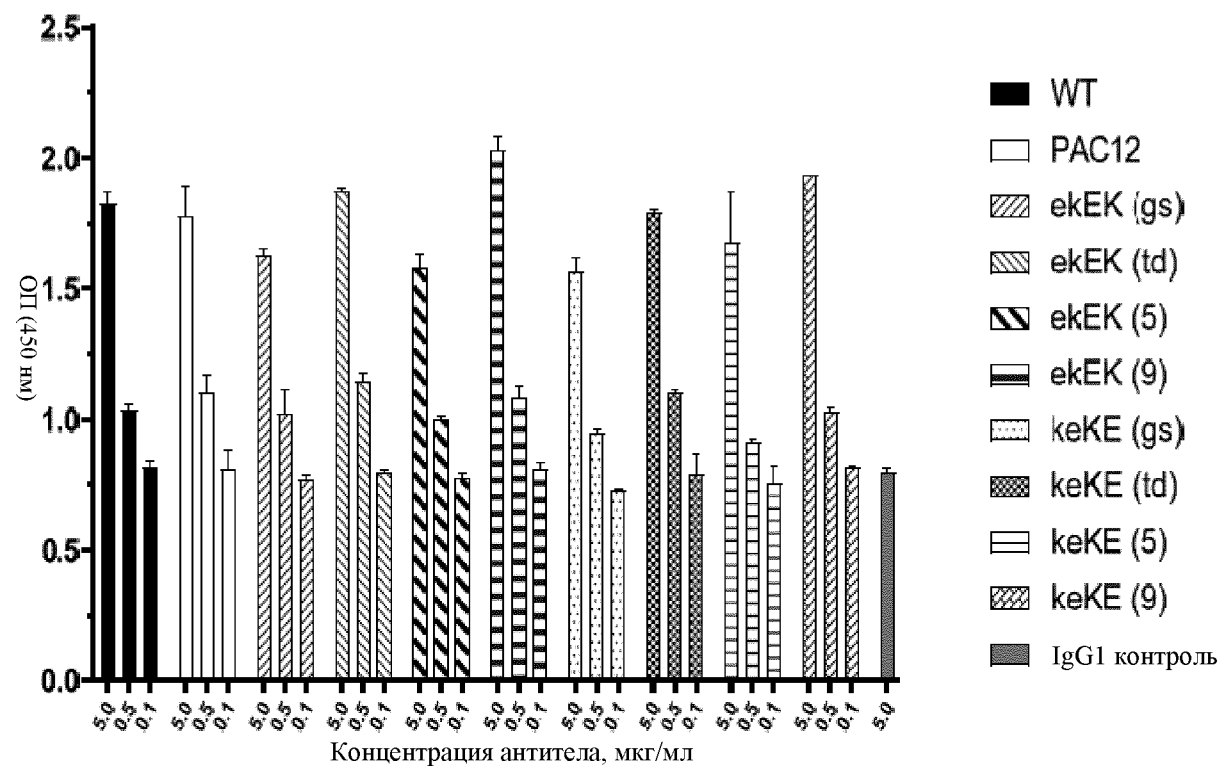
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 6Д

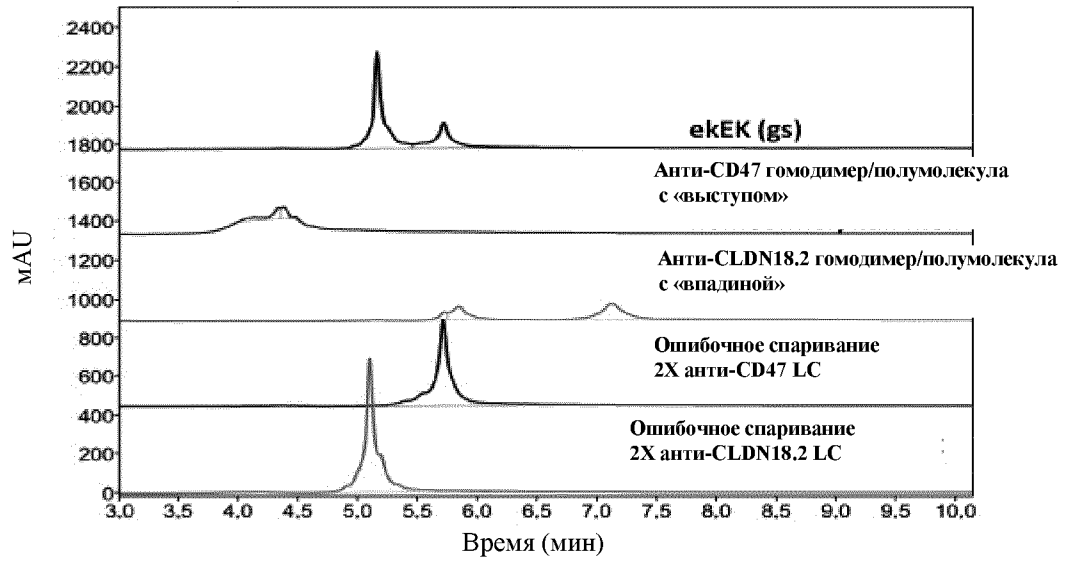


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

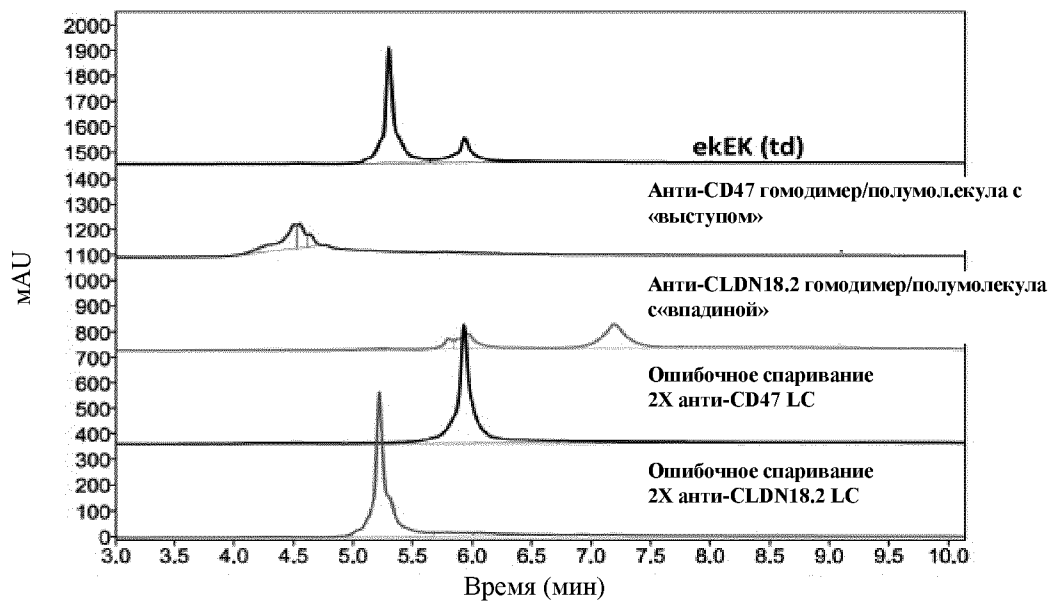
Фиг. 6Е



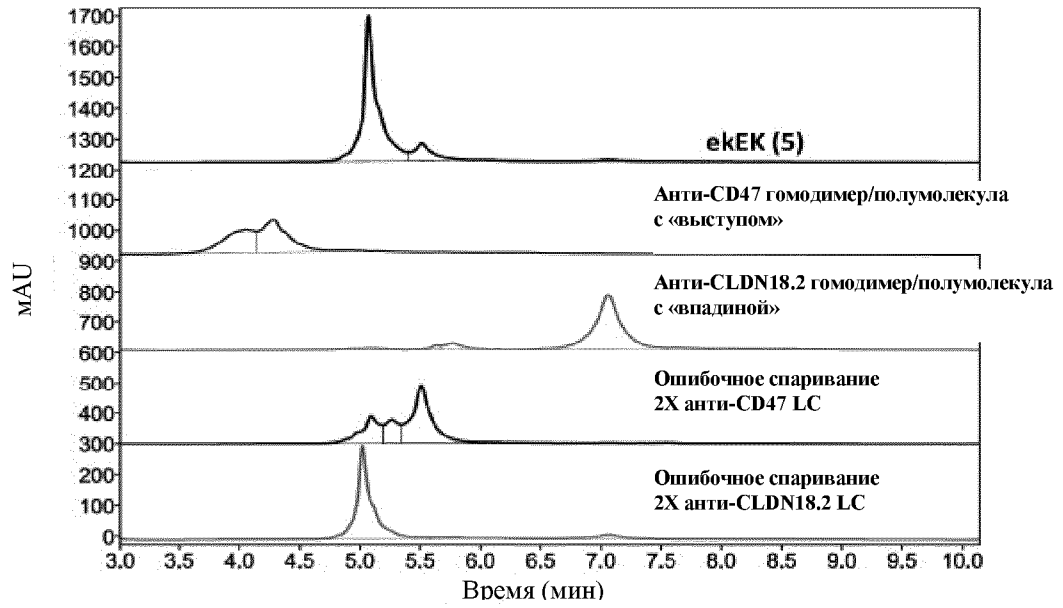
Фиг. 7А



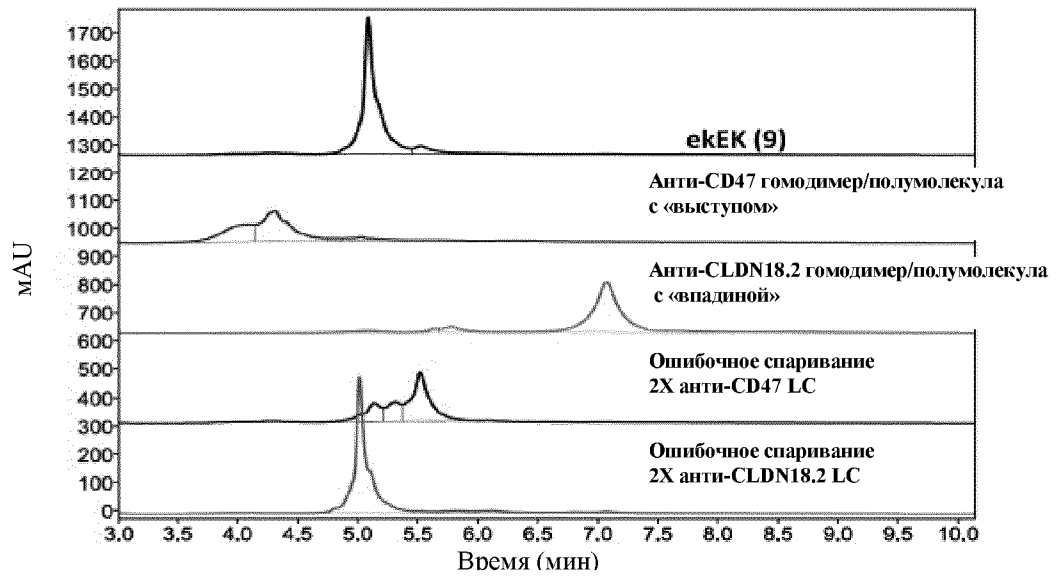
Фиг. 7Б



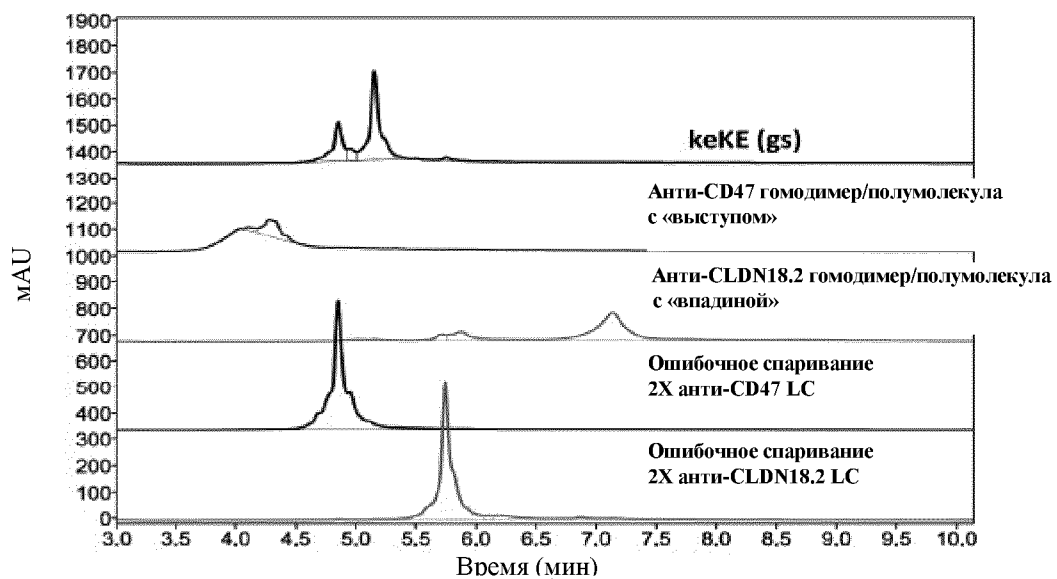
Фиг. 7В



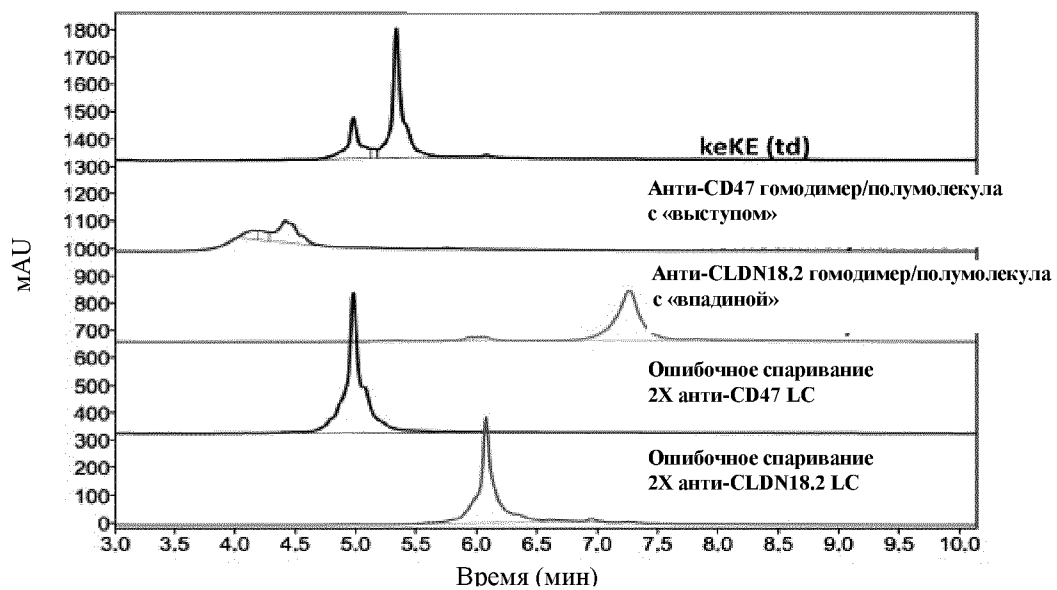
Фиг. 7Г



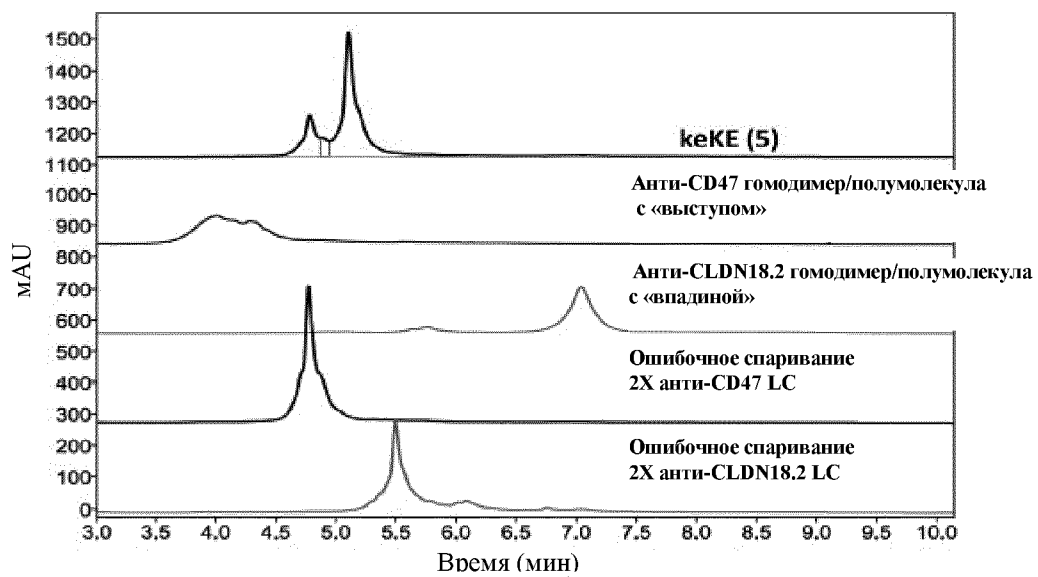
Фиг. 7Д



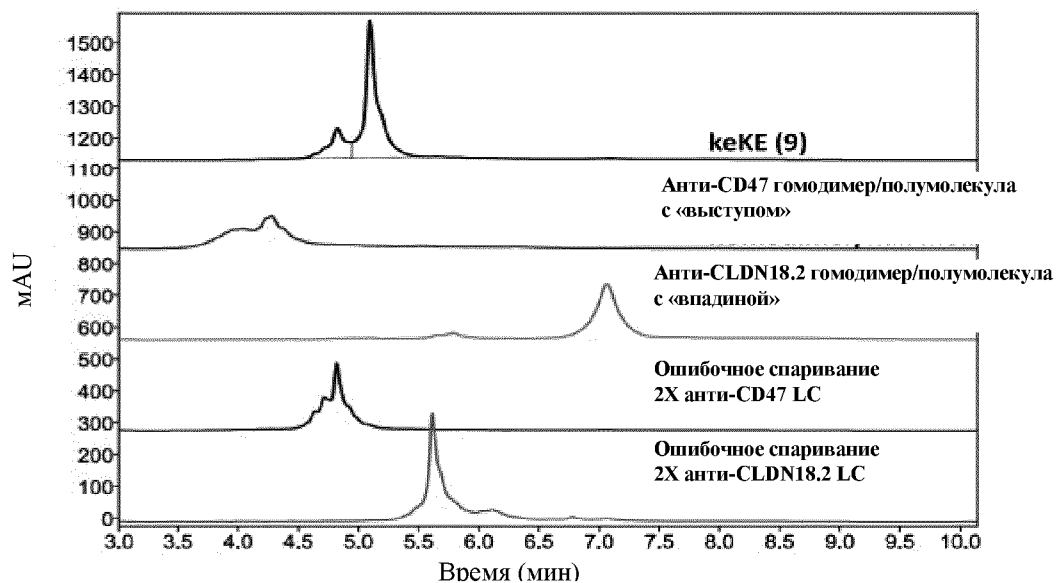
Фиг. 7Е



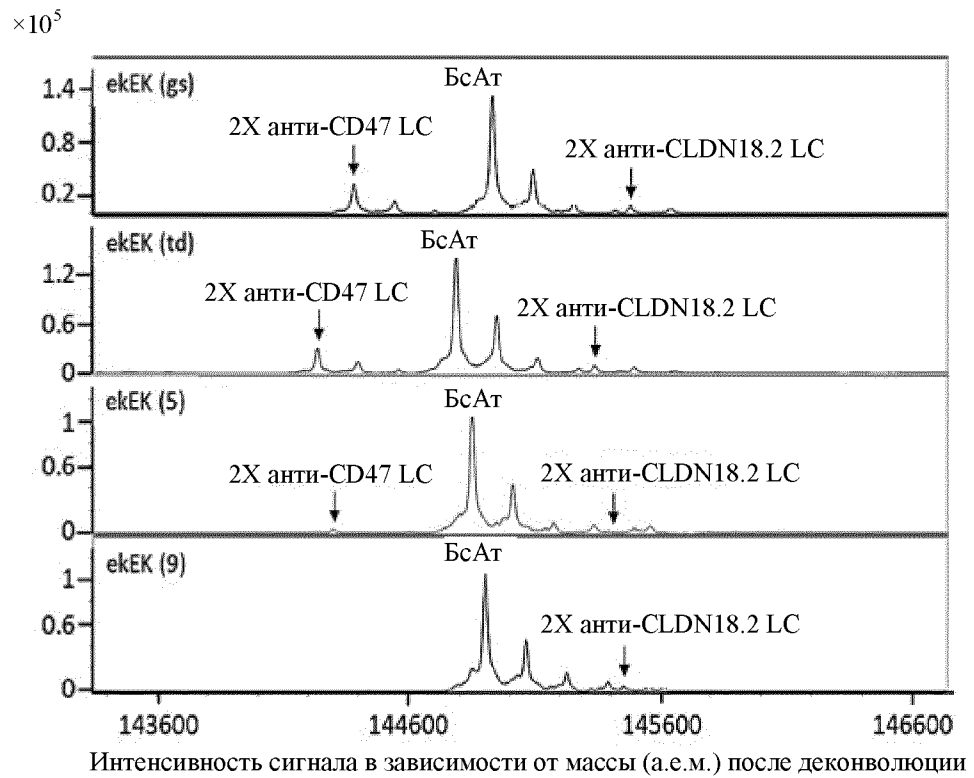
Фиг. 7Ж



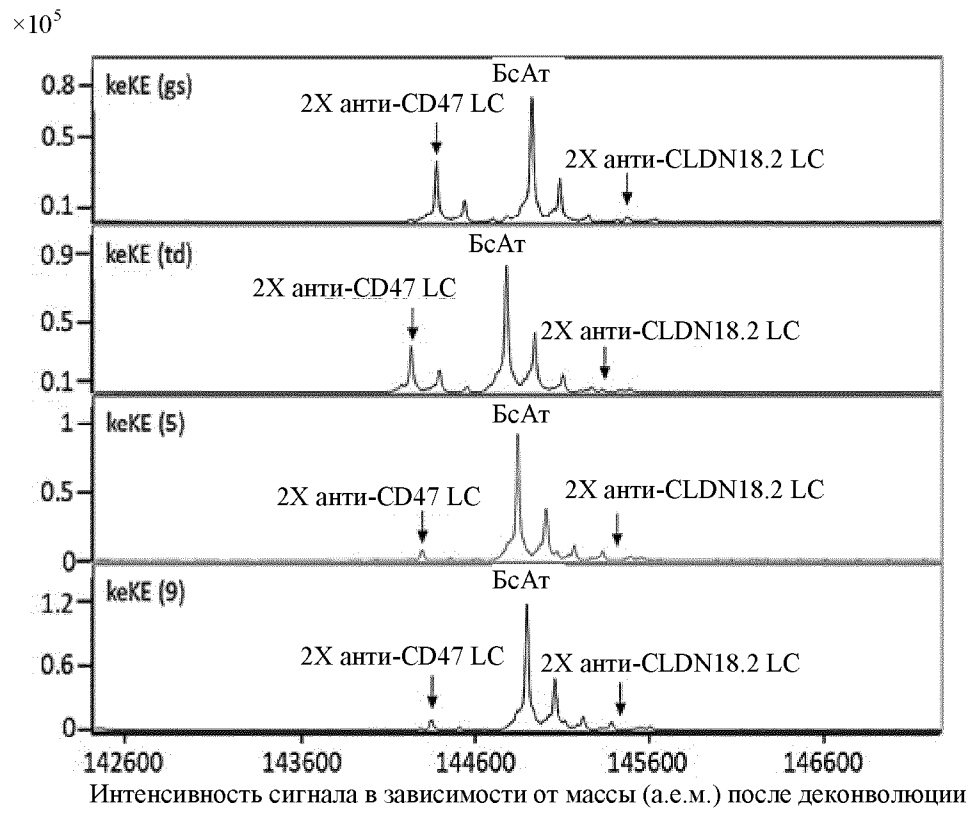
Фиг. 73



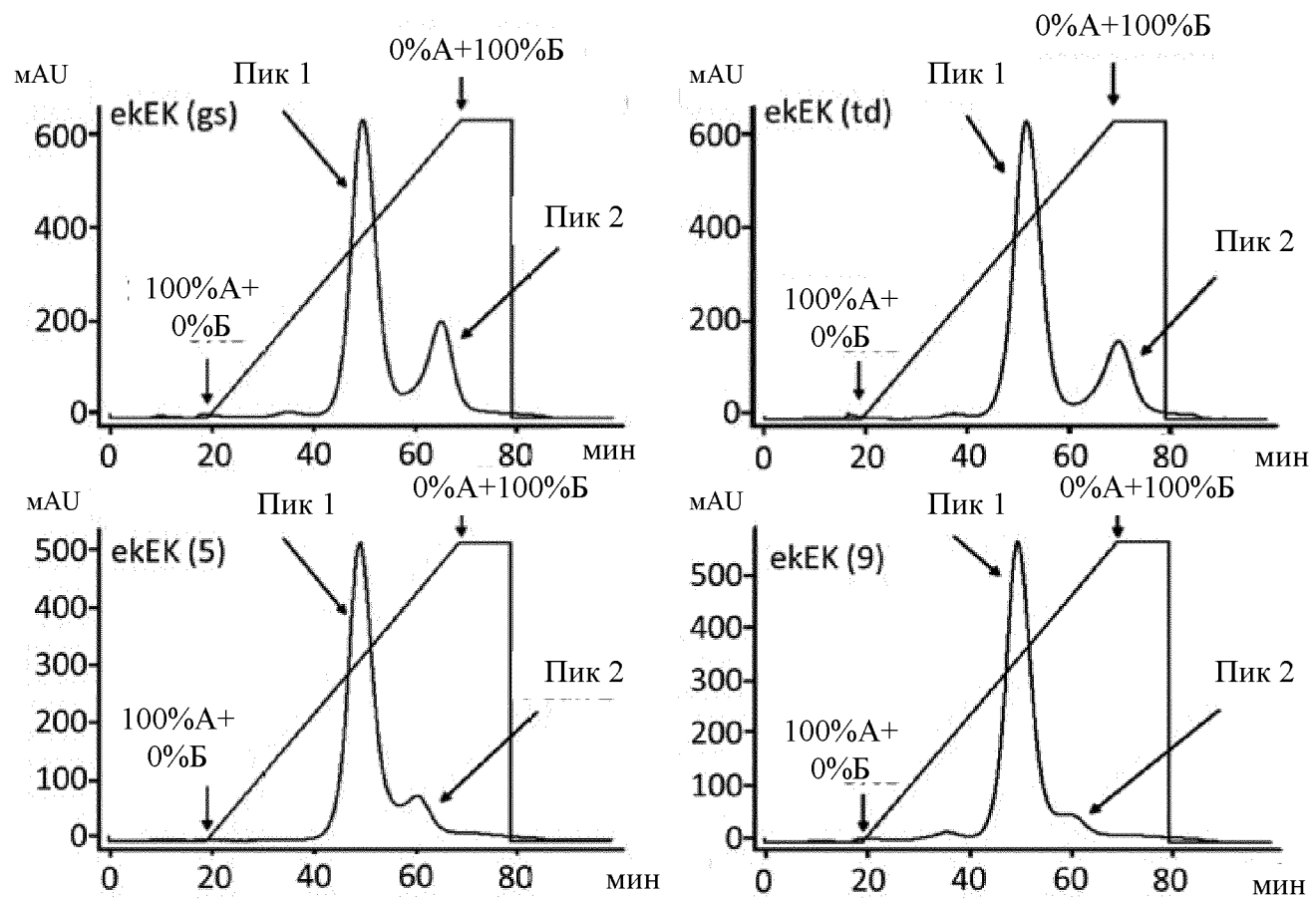
Фиг. 7И



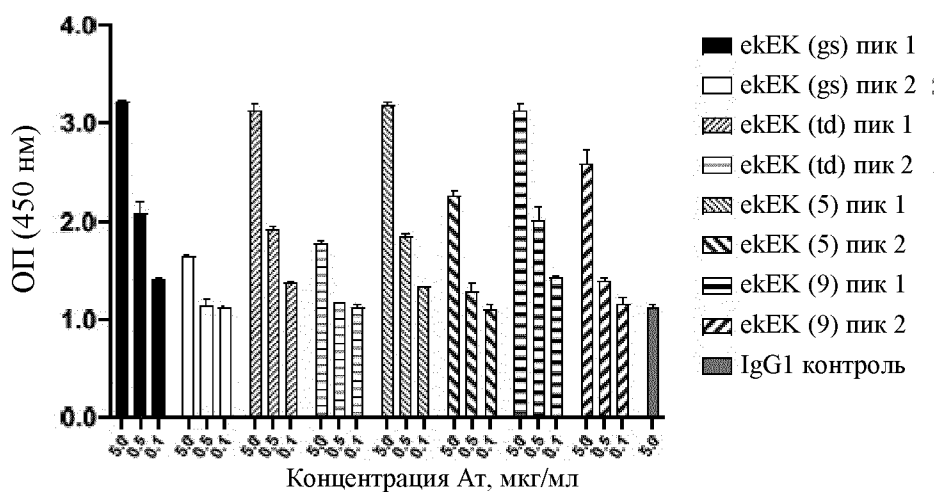
Фиг. 7К



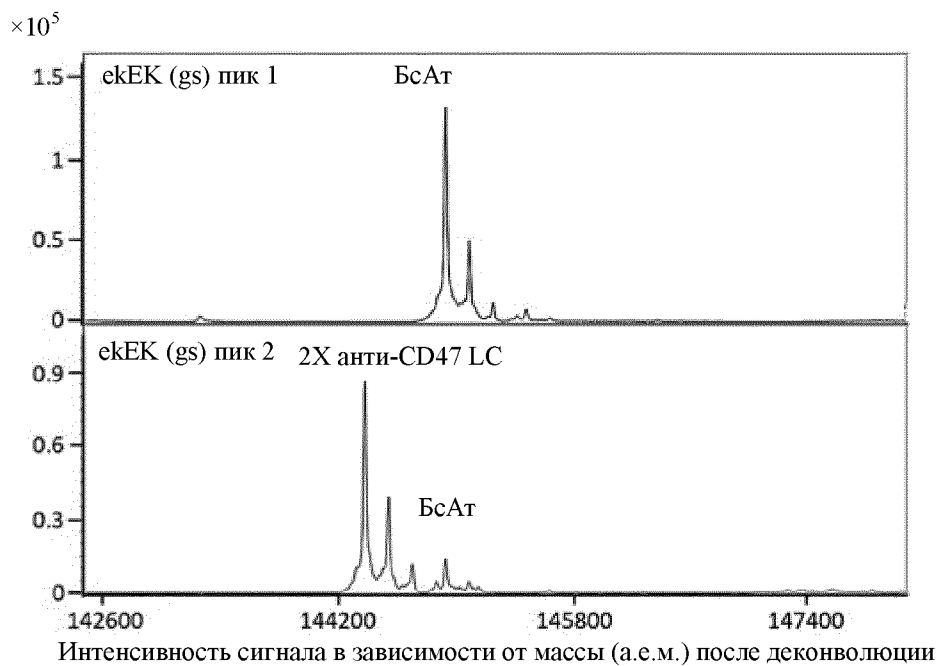
Фиг. 7Л



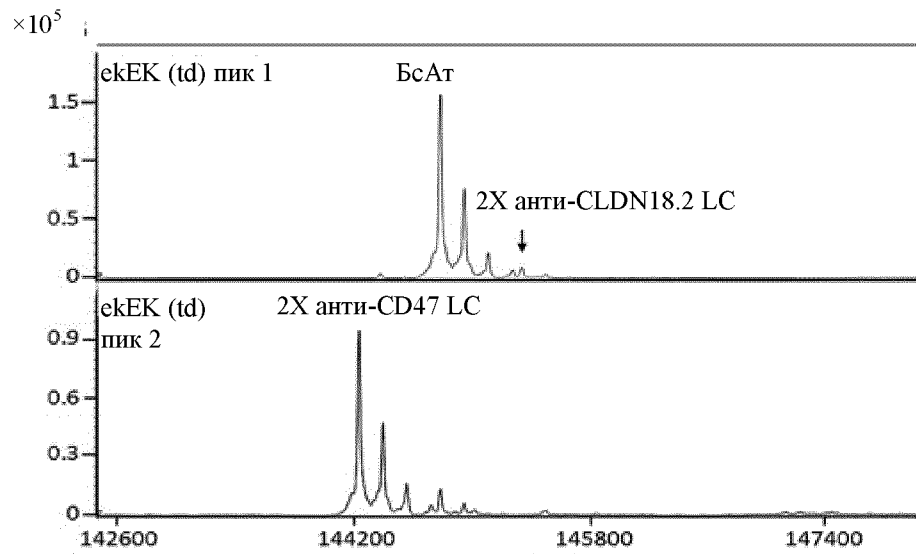
Фиг. 8А



Фиг. 8Б

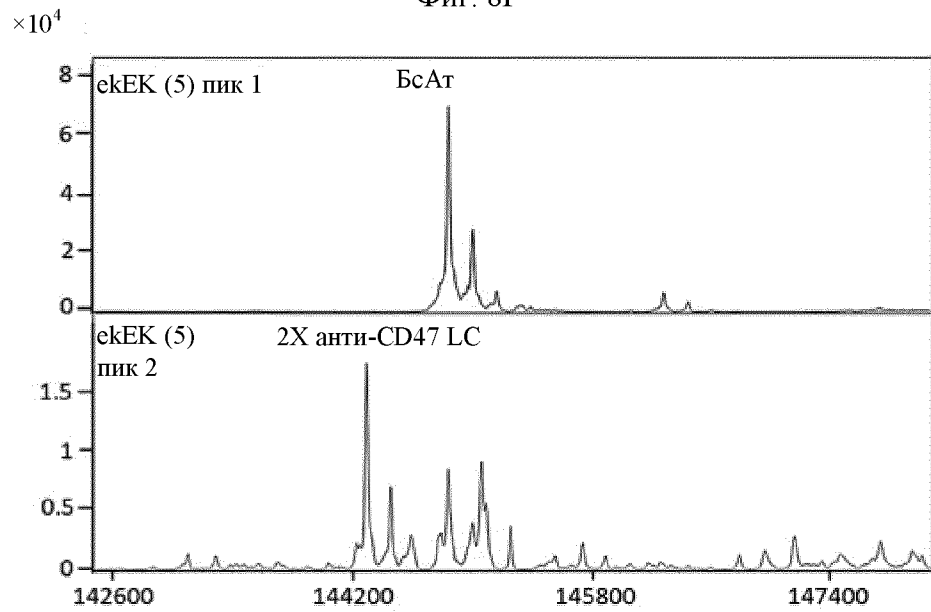


Фиг. 8В



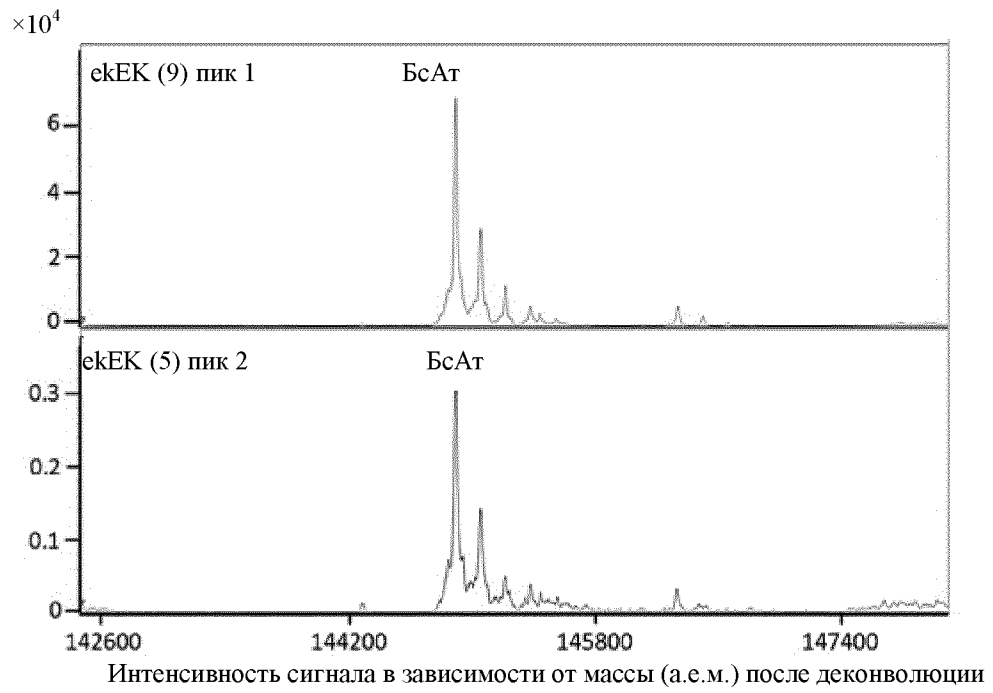
Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

Фиг. 8Г

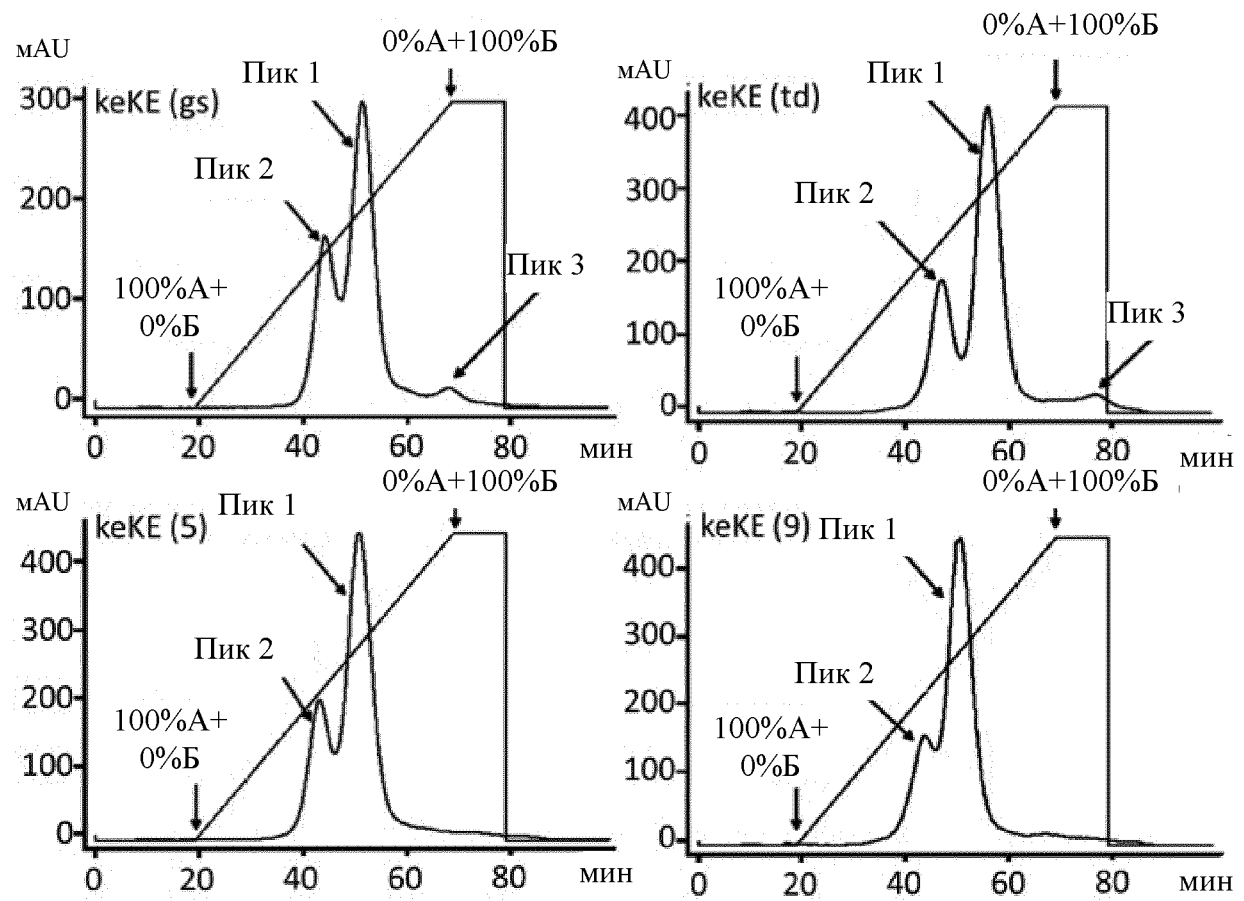


Интенсивность сигнала в зависимости от массы (а.е.м.) после деконволюции

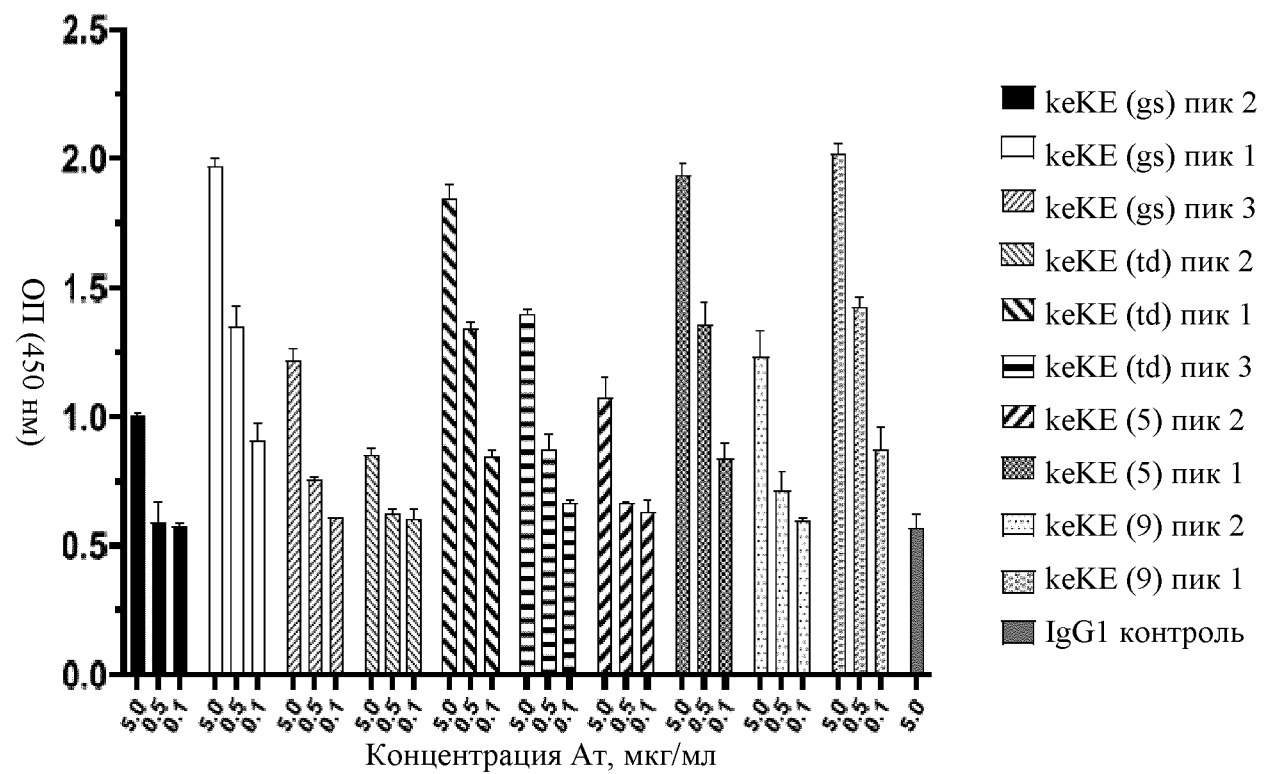
Фиг. 8Д



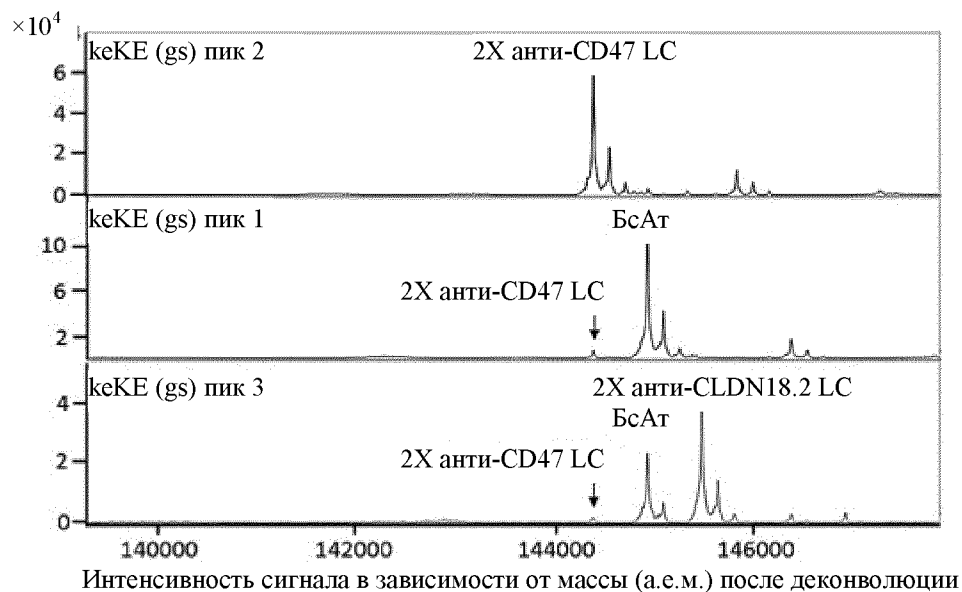
Фиг. 8Е



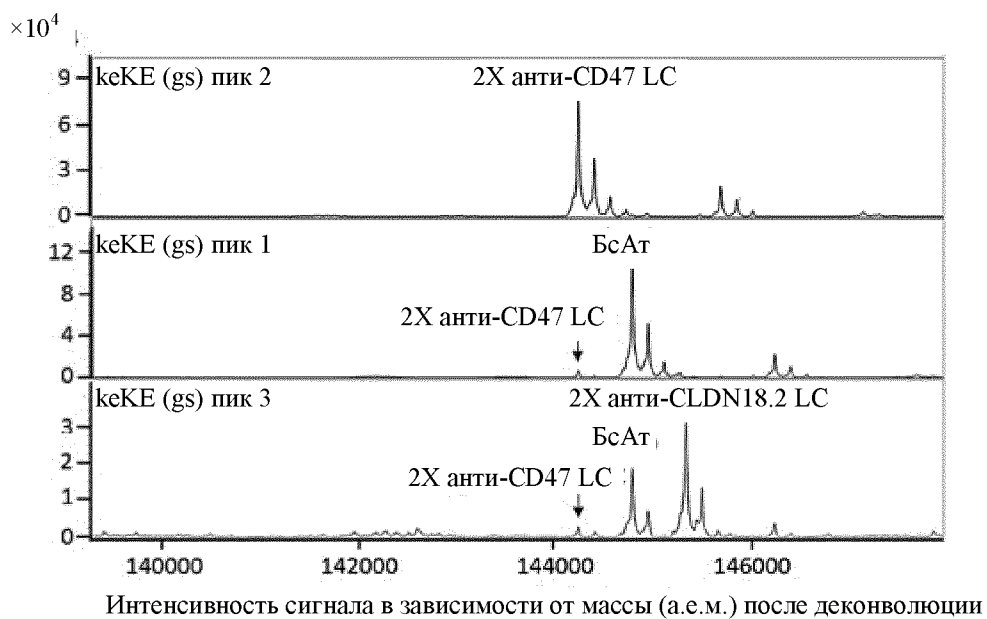
Фиг. 8Ж



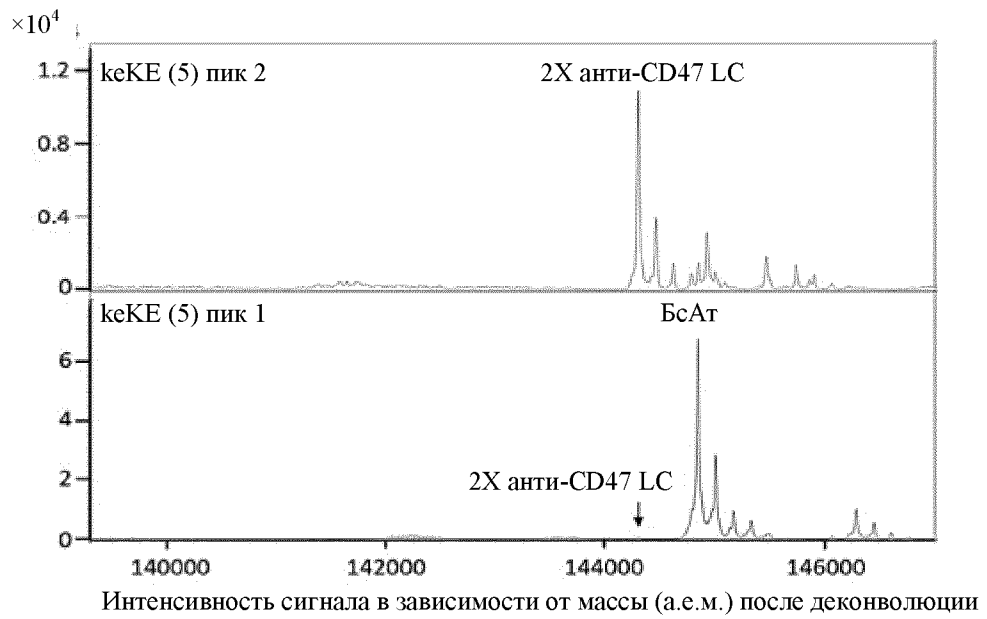
Фиг. 83



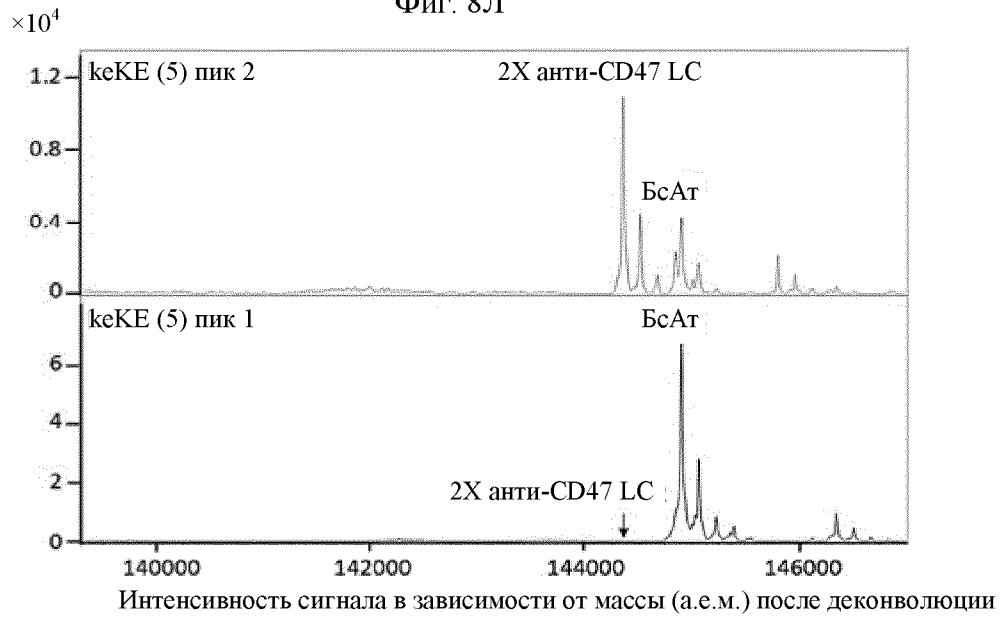
Фиг. 8И



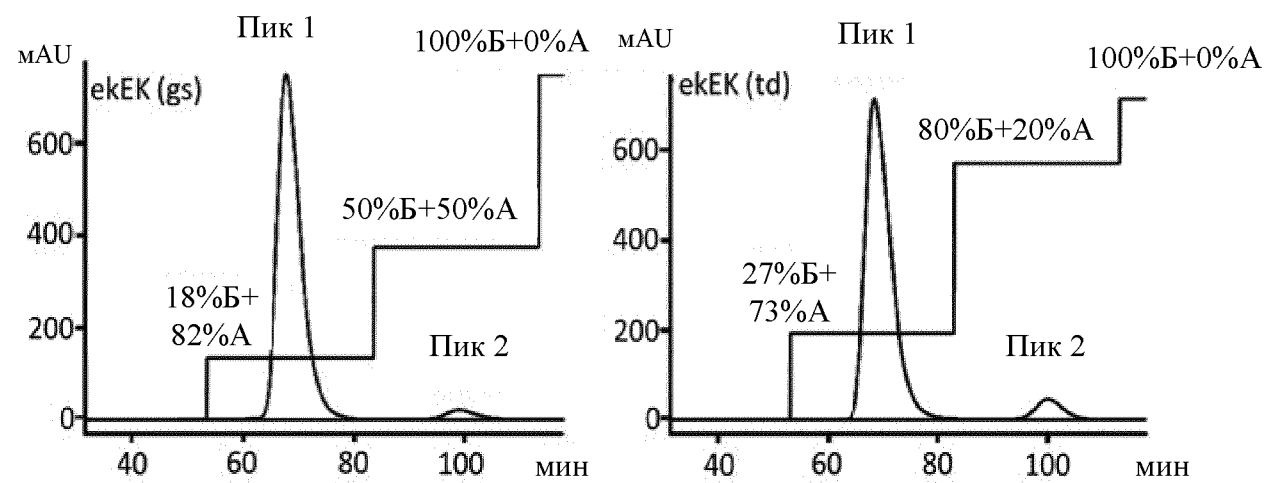
Фиг. 8К



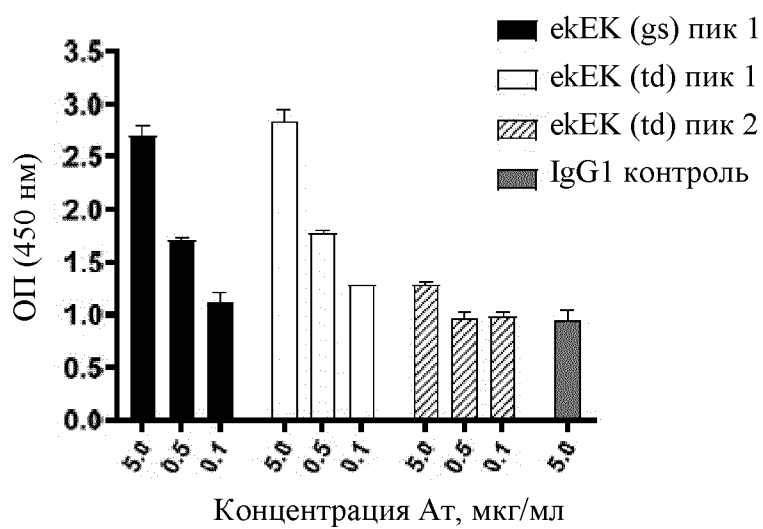
Фиг. 8Л



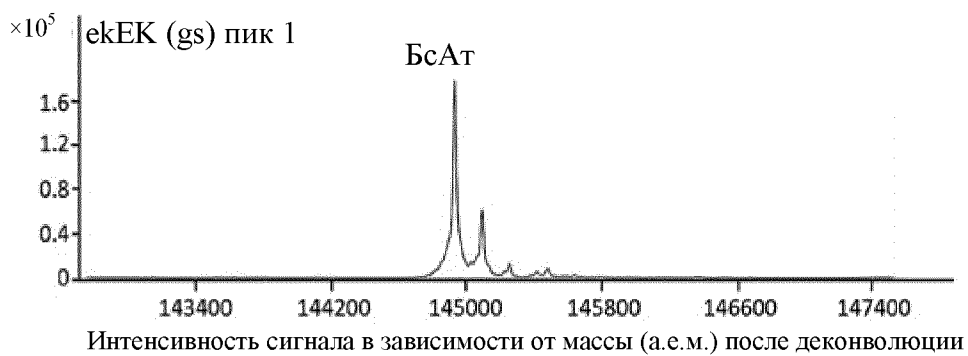
Фиг. 8М



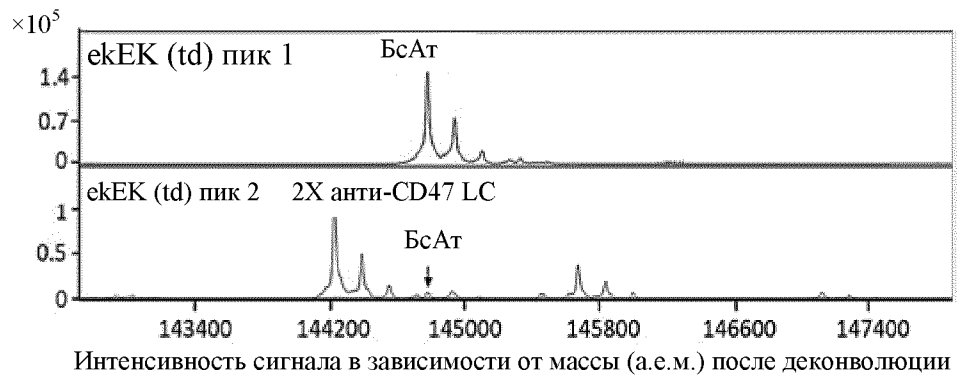
Фиг. 9А



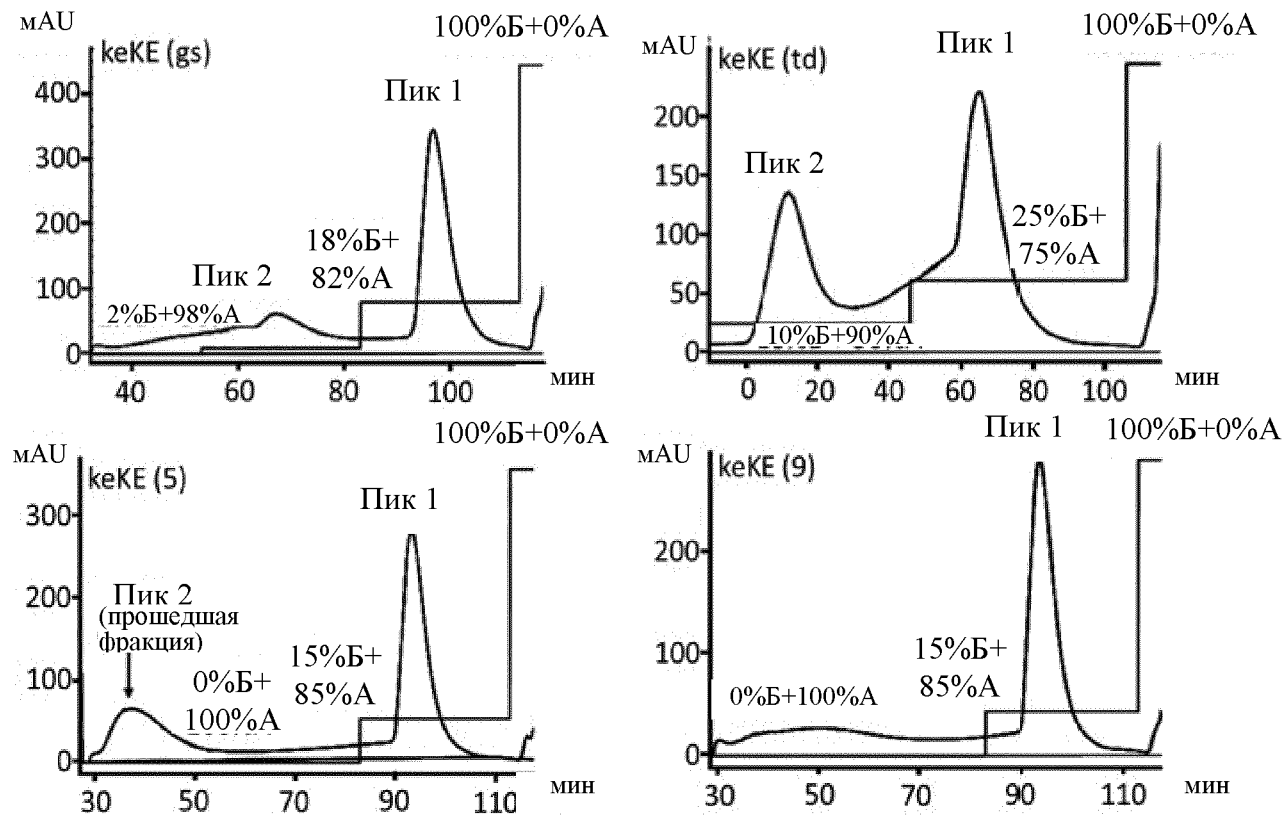
Фиг. 9Б



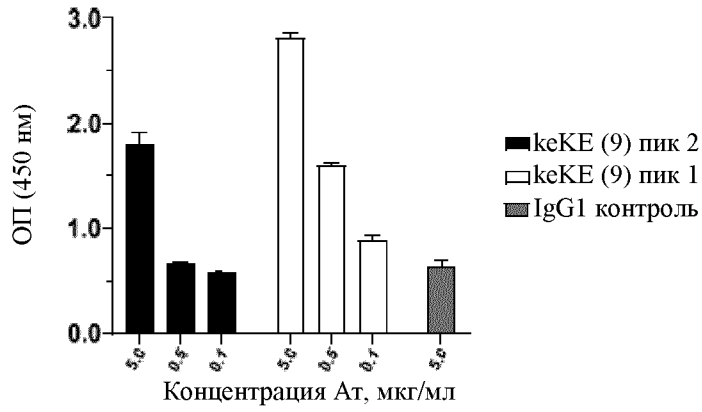
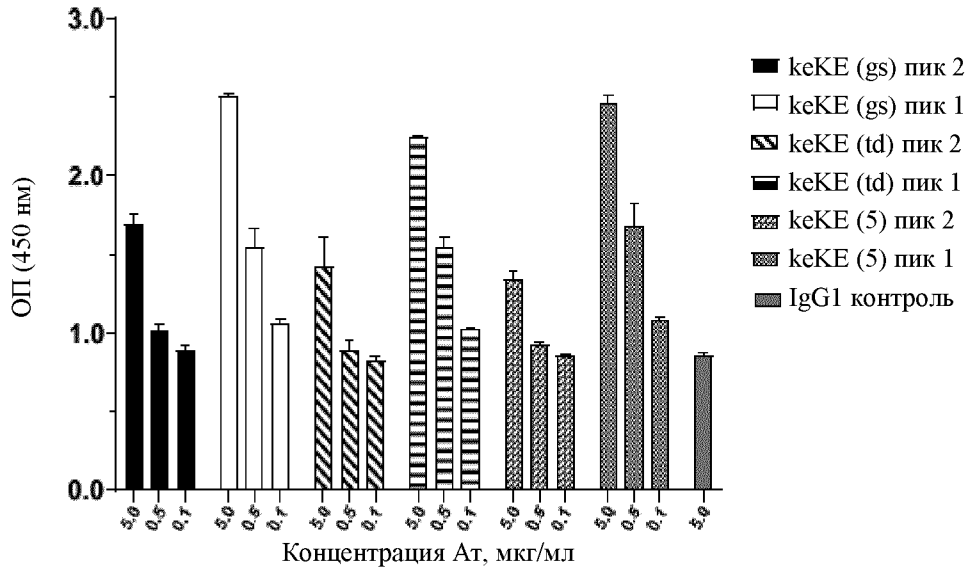
Фиг. 9В



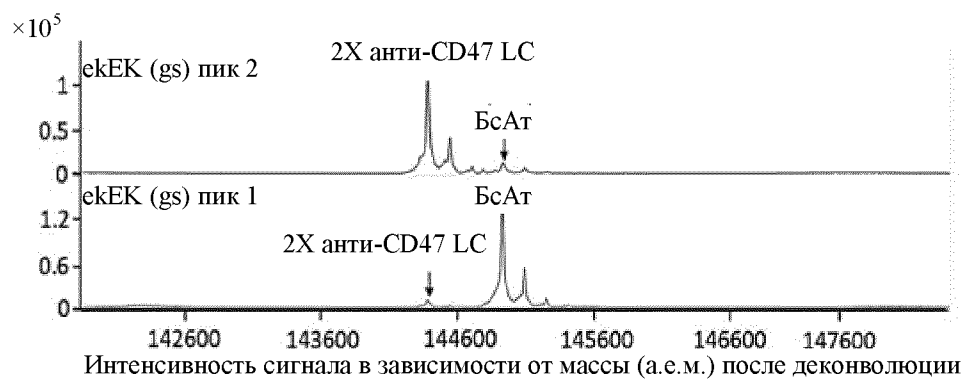
Фиг. 9Г



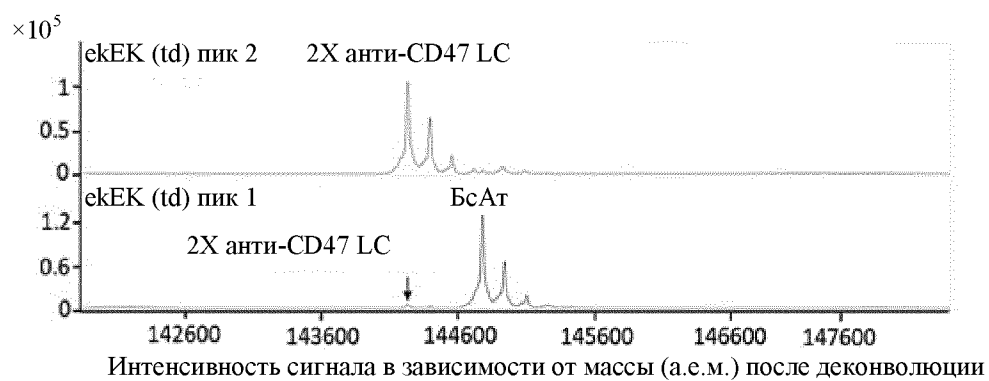
Фиг. 9Д



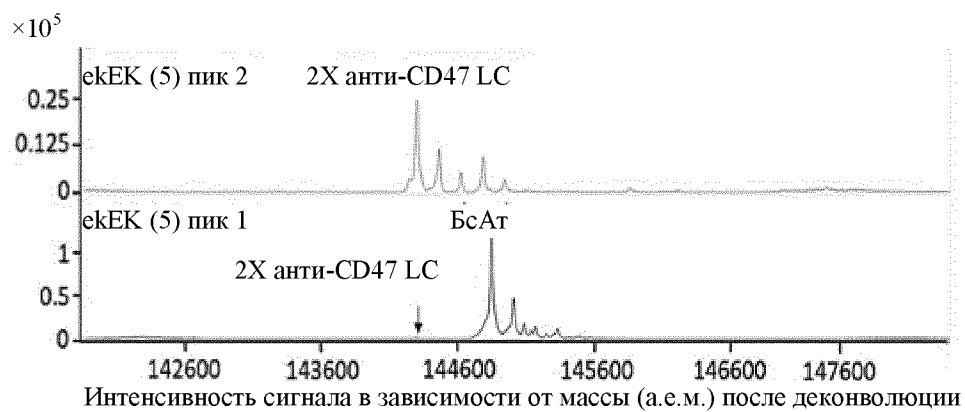
Фиг. 9Е



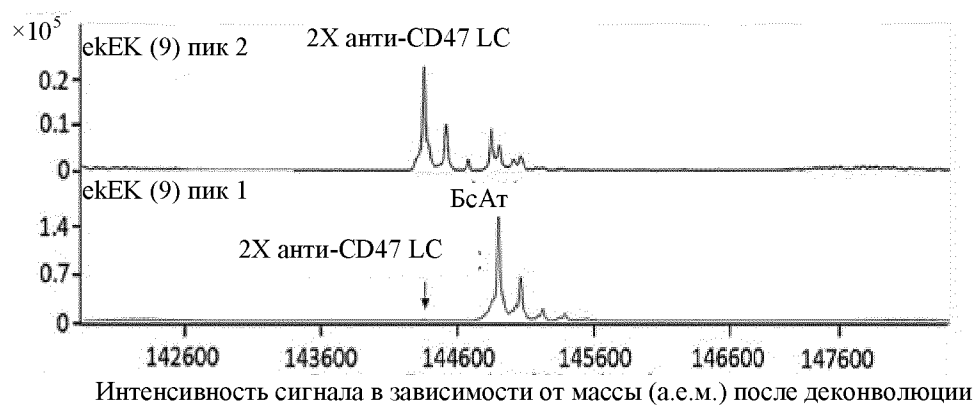
Фиг. 9Ж



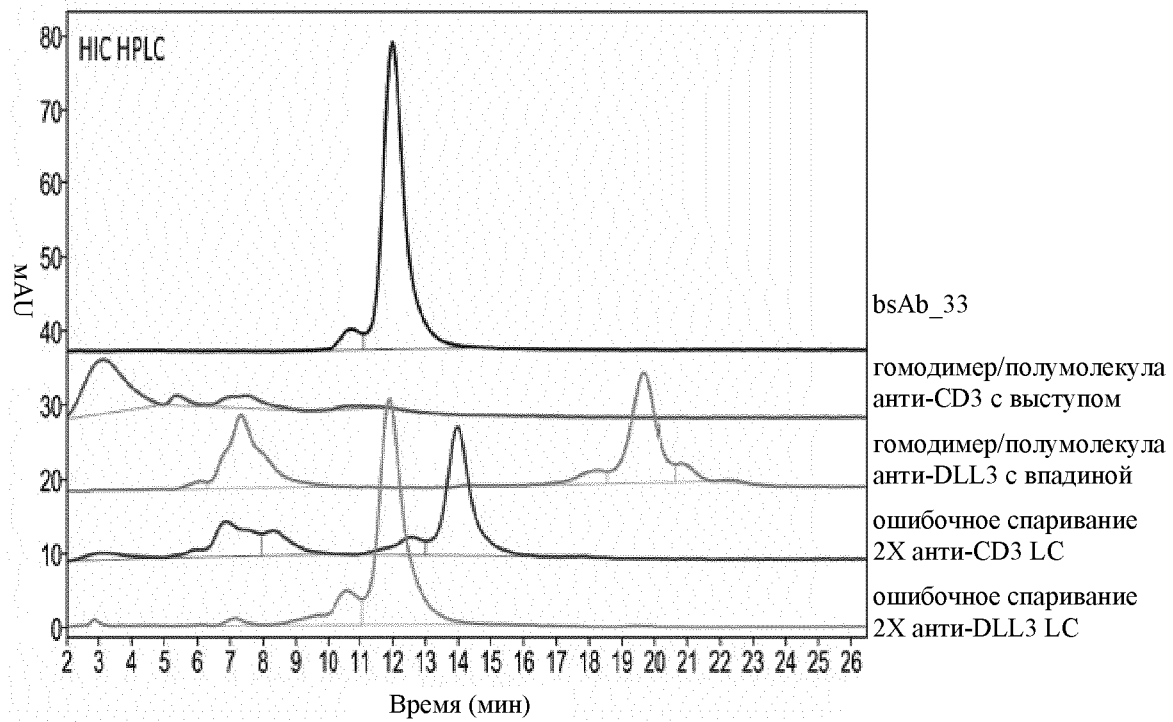
Фиг. 9З



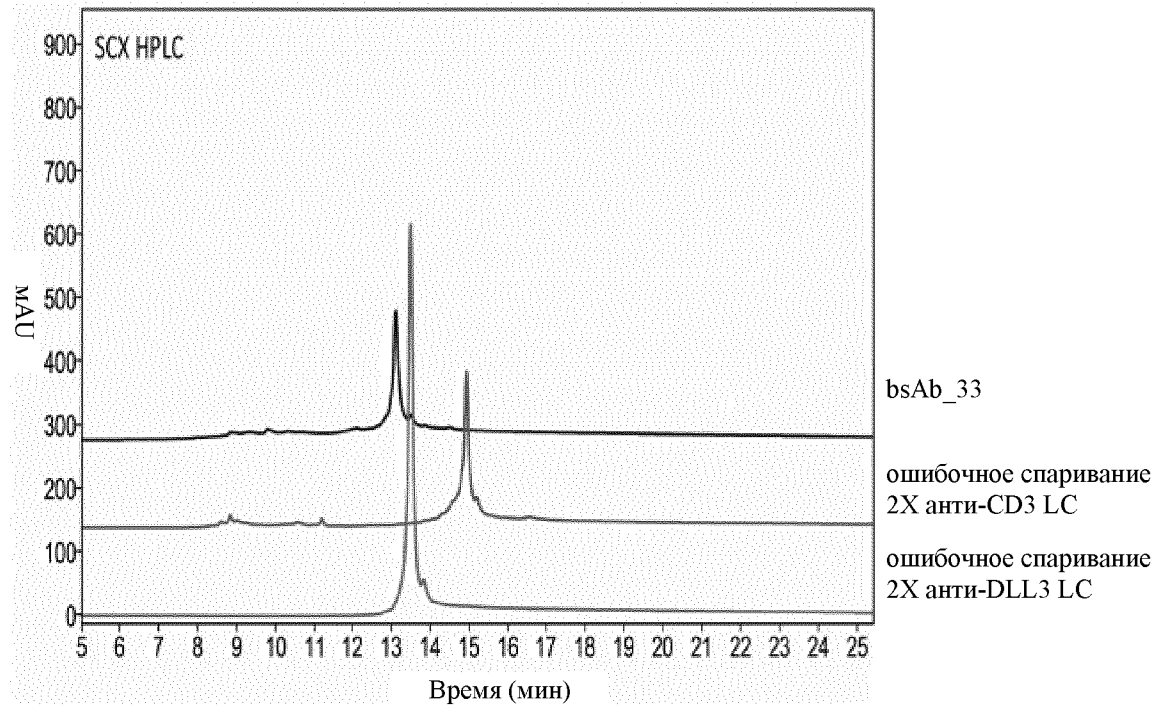
Фиг. 9И



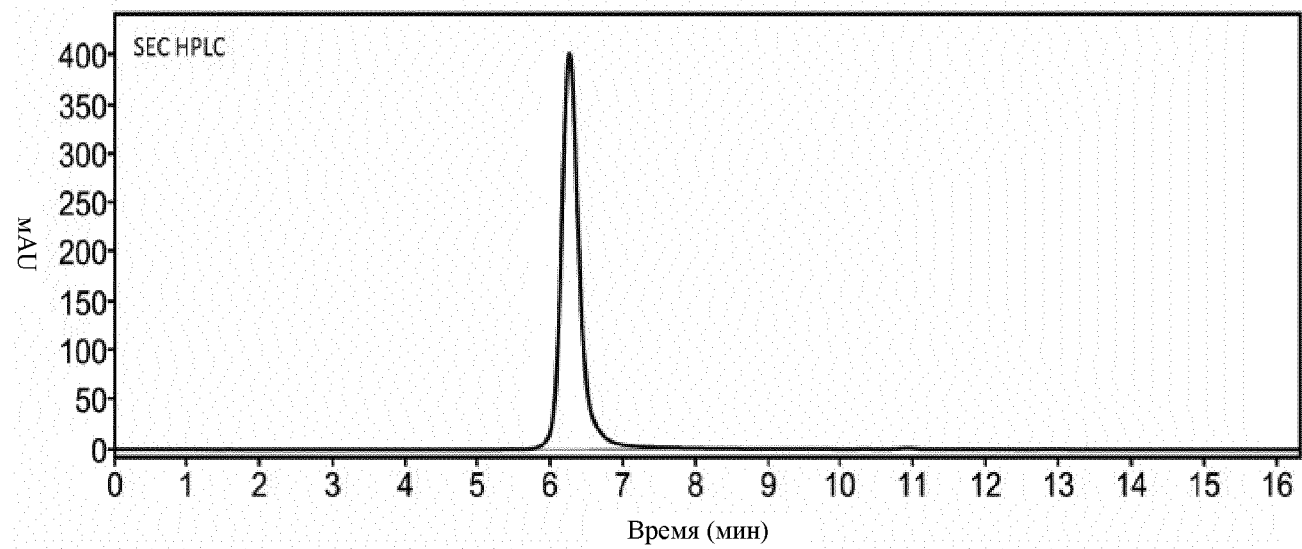
Фиг. 9К



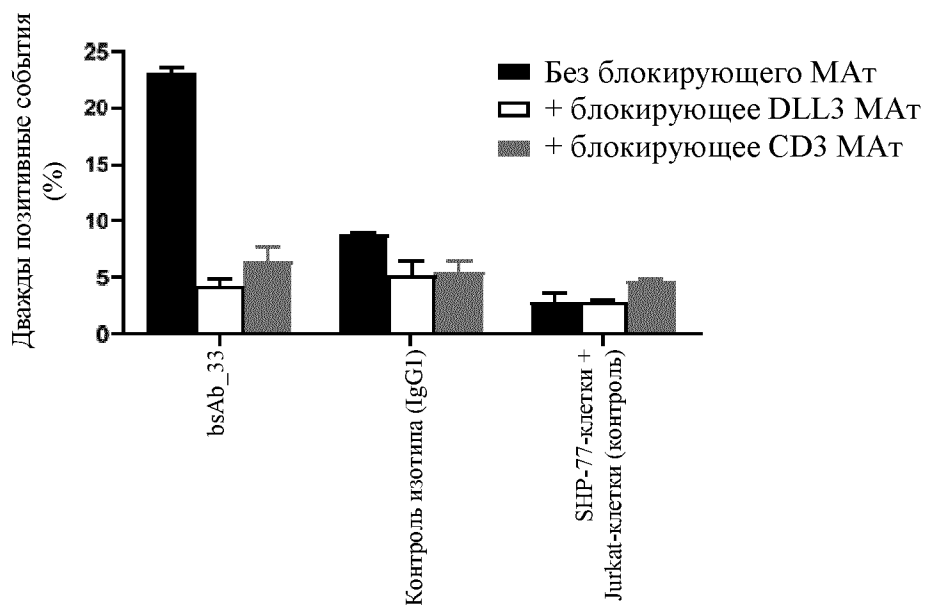
Фиг. 10А



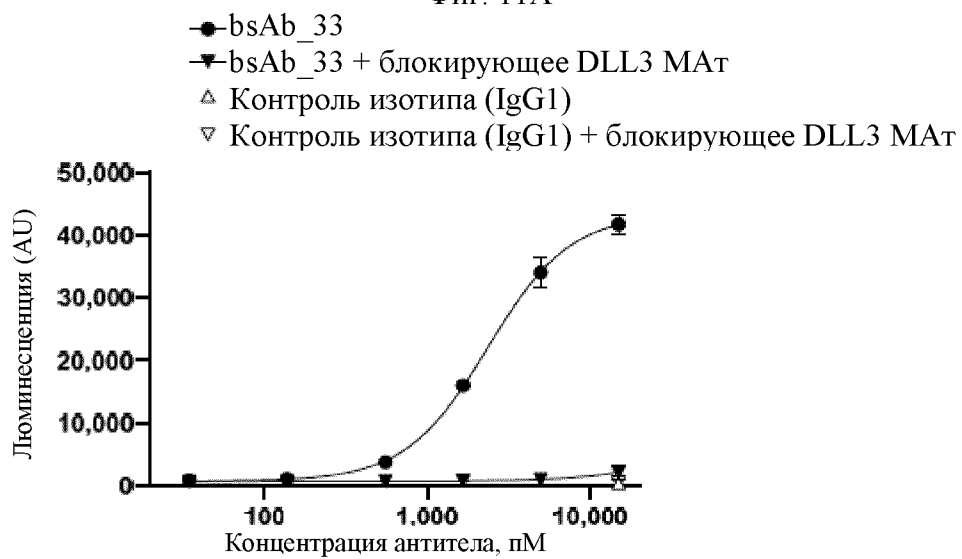
Фиг. 10Б



Фиг. 10В



Фиг. 11А



Фиг. 11Б