

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392551** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.11.07**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2022.05.09**

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С В7Н4 И CD3**

---

(31) **63/185,762**

(32) **2021.05.07**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2022/062518**

(87) **WO 2022/234146 2022.11.10**

(71) Заявитель:  
**ГЕНМАБ А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

**Сахлин Мартин, Абдулрахман  
Абдаллах (DK), Коу Джесси, Абади  
Чарльз (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,  
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,  
Христофоров А.А. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам, содержащим антитела, связывающиеся с В7Н4 и CD3. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению указанных фармацевтических композиций и единичных лекарственных форм в терапевтических и диагностических процедурах, в частности в терапии рака.

---

**A1**

**202392551**

**202392551**

**A1**

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С V7H4 И CD3

## Описание

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам биспецифических антител, связывающихся с V7H4 и CD3, и к применению таких фармацевтических композиций или единичных лекарственных форм.

### **Введение**

V7H4 (V7-H4, домен V-set, содержащий ингибитор-1 активации Т-клеток или VTCN1) является членом семейства белков V7, которое содержит белковые лиганды клеточной поверхности, которые связываются с рецепторами на лимфоцитах. Семейство V7 играет важную роль в регуляции иммунных ответов. V7H4 отрицательно регулирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы, ингибируя активацию, пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность Т-клеток (Prasad et al., 2003, Immunity 18: 863-873). V7H4 представляет собой трансмембранный белок типа I, который включает в себя короткий внутриклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и внеклеточный домен с IgV- и IgC-подобным доменом с четырьмя консервативными остатками цистеина и семью сайтами для N-связанного гликозилирования. (Sica et al., 2003, Immunity 18: 849-861). На сегодняшний день рецептор для V7H4 не идентифицирован.

В нормальной ткани взрослого человека экспрессия V7H4 очень ограничена, при этом экспрессия V7H4 обнаруживается на опухолевых клетках многих раковых тканей (Kaur and Janakiram, 2019, ESMO Open 4:e000554). При раке экспрессия V7H4 коррелирует с поздними стадиями рака, плохим прогнозом и снижением общей выживаемости пациентов.

Поэтому нацеливание на V7H4 было предложено для лечения рака (Podojil and Miller, Immunological Reviews, 2017: 276; 40-51). В настоящее время разрабатываются антитела, связывающие V7H4, для терапии рака. Например, FPA150 представляет собой афукозилированное человеческое антитело, которое снимает опосредованное V7H4 подавление активации Т-клеток и проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) (Wainberg et al., 2019, Annals of Oncology 30, Suppl. 5, v489 (1198P)). В настоящее время он проходит ранние клинические испытания в качестве монотерапии или в комбинации с пембролизумабом в распространенных солидных опухолях.

Также были предприняты попытки нацелить Т-клетки на В7Н4. Биспецифическое одноцепочечное антитело к В7Н4/CD3, Fab scFv, было получено на основе структуры Fab и одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) мышиного антитела против человеческого В7Н4 и мышиного антитела против человеческого CD3 (Iizuka et al., 2019, Clin Cancer Res 25: 2925-2934). Smith et al. описали сконструированные Т-клетки с В7Н4-специфическими химерными антигенными рецепторами (chimeric antigen receptor, CAR), которые проявляли противоопухолевую активность в отношении В7Н4-положительных ксенотрансплантатов опухоли яичников человека, но которые также демонстрировали мультиорганную лимфоцитарную инфильтрацию и летальную токсичность (Smith et al. 2016, Molecular Therapy, Vol.24 Iss. 11 pp 1987-99) у мышей.

Несмотря на некоторый достигнутый прогресс, сохраняется потребность в разработке терапии рака на основе антител, нацеленной на В7Н4, которая была бы эффективной и/или безопасной для применения на людях. Существует также потребность в фармацевтически приемлемых композициях антител для применения в такой терапии.

### **Сущность настоящего изобретения**

Целью настоящего изобретения является создание новых фармацевтических композиций антител, содержащих антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, которая связывается с CD3, например с CD3ε (эпсилон) человека. Еще одной целью является создание фармацевтических композиций антител, причем эти составы являются стабильными в широком диапазоне концентраций антител и/или температур. Еще одной целью является создание фармацевтических композиций антител, причем эти составы являются стабильными в течение по меньшей мере 3 месяцев или даже дольше, например по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев. Еще одной целью настоящего изобретения является создание фармацевтических составов антител, которые хорошо переносятся при в/в инфузии. Антигенсвязывающие области таких антител содержат по меньшей мере человеческие каркасные области, такие как, например, FR1, FR2, FR3 и FR4. Наиболее предпочтительно, чтобы все каркасные области были человеческими. Такие антигенсвязывающие области представляют собой гуманизированные и/или человеческие антигенсвязывающие области. Эти фармацевтические композиции полезны при лечении состояний, при которых желательны специфическое нацеливание и опосредованный Т-клетками киллинг экспрессирующих В7Н4 клеток, например при таких состояниях, как рак. Предпочтительно, фармацевтическая композиция подходит для применения на людях, например при медицинском лечении. Виды рака, которые могут быть подходящими для

лечения, представляют собой солидные опухоли. Указанные экспрессия В7Н4 и опосредованный Т-клетками киллинг, например в раковых клетках, могут варьироваться в соответствии с настоящим изобретением от относительно низкой экспрессии В7Н4, такой как в клетках MCF-7, до относительно высокой экспрессии В7Н4, такой как в клетках SK-BR3, как показано, например, в примере 12. Более предпочтительно, такие биспецифические антитела содержат замены в константной области, которые делают область Fc, если она присутствует, инертной. Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению подходит для в/в введения.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей а) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, и б) буферное средство, причем рН данной композиции составляет от 4,0 до 8,0, предпочтительно от 4,5 до 6,5, наиболее предпочтительно от 5,0 до 6,0. Буферное средство, предпочтительно, выбрано из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей, и фармацевтическая композиция, предпочтительно, дополнительно содержит неионогенное вспомогательное вещество. Было обнаружено, что такие фармацевтические композиции обеспечивают удивительно высокую стабильность антитела, такую как термическая стабильность и стабильность при хранении, а также высокую степень растворимости.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, которая способна связываться с CD3, таким как CD3ε (эпсилон) человека, причем антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, 29 или 31, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 33, и причем антигенсвязывающая область, которая способна связываться с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 18, 19 и 21, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID

NO: 23, GTN и 24. Предпочтительно, области CDR определяют с помощью способа IMGT, описанного ниже.

Согласно другому аспекту указанные фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением предназначены для применения при медицинском лечении.

### **Краткое описание фигур**

**Фигура 1. Определение домена В7Н4, участвующего в связывании, с использованием химерных молекул В7Н4-В7Н3.** Специфичность к домену В7Н4 антител к В7Н4 определяли с использованием панели клеток, трансфицированных для экспрессии человеческого В7Н4 (I), химерных молекул человеческих В7Н4-В7Н3 В7Н3-IgV/В7Н4-IgC (II) или В7Н4-IgV/В7Н3-IgC (III) или человеческого В7Н3 (IV). Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. А = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C4-FEAR; В = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR; С = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR; D = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-FEAR; E = IgG1-В7Н3-ВРСА84D.

**Фигура 2. Связывание антител к В7Н4 с В7Н4, В7Н3 или химерными молекулами В7Н4-В7Н3.** Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR с клетками НЕК, временно трансфицированными для экспрессии человеческого В7Н4 или химерных молекул В7Н4-В7Н3 В7Н3-IgV/В7Н4-IgC или В7Н4-IgV/В7Н3-IgC, оценивали с использованием проточной цитометрии.

**Фигура 3. Связывание антител к В7Н4 с вариантами В7Н4 с мутациями аланина в ECD.** Связывание выражали как кратность изменения по сравнению с эталонным антителом. Кратность изменения определяли как  $\text{Log}_{10}(\text{нормализованное } gMFI[\text{ala mutant}]/\text{нормализованное } gMFI[\text{wt}])$ . Остатки, у которых кратность изменения при связывании была ниже средней кратности изменения  $-1,5 \times \text{CO}$ , рассматривали как «мутантов с потерей связывания». Остатки с положительной кратностью изменения связывания представляют собой остатки с потерей связывания для эталонного антитела. Числа под осью x относятся к положениям аминокислот. (А) Результаты для C1-N52S с C2 в качестве эталонного антитела. (В) Результаты для C2 с C1-N52S в качестве эталонного антитела. (С) Результаты для C3 с C2 в качестве эталонного антитела.

**Фигура 4. Связывание антитела к В7Н4 и биспецифического антитела к CD3xB7Н4 с В7Н4 человека и яванского макака.** Связывание IgG1-В7Н4-C1-N52S-FEAR (А) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR (В) с клетками НЕК-293F, временно трансфицированными В7Н4 человека или В7Н4 яванского макака, определяли с

помощью проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки НЕК-293F (С) использовали в качестве отрицательного контроля; для них показано связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

**Фигура 5. Связывание антитела к В7Н4 и биспецифического антитела к CD3×В7Н4 с В7Н4 кролика, крысы, мыши, собаки и свиньи.** Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (А) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В) с клетками НЕК-293F, временно трансфицированными В7Н4 кролика, крысы, мыши, собаки или свиньи, определяли с помощью проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки НЕК-293F (С) использовали в качестве отрицательного контроля; для них показано связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

**Фигура 6. Связывание антител к В7Н4 с клетками НЕК-293F, временно трансфицированными В7Н4 различных видов.** Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (А), IgG1-B7H4-C3-FEAR (В), IgG1-B7H4-C2-FEAR (С), IgG1-B7H4-C4-FEAR (D) и IgG1-B7H4-C5-FEAR (Е) с клетками НЕК-293F, трансфицированными В7Н4 человека, яванского макака, мыши, крысы или свиньи, или с нетрансфицированными клетками НЕК-293F, определяли с помощью проточной цитометрии. IgG1-b12 использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела (не показано).

**Фигура 7. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (А) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В) с клетками MCF-7 и MDA-MB-468.** Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. IgG1-b12 (С) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (D) использовали в качестве несвязывающих контрольных антител.

**Фигура 8. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (А) с клетками NIH-OVCAR-3, HCC1954 и HeLa.** Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (В) использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела.

**Фигура 9. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (А) и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В) с клетками SK-BR3 и MDA-MB-486.** Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (С) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (D) использовали в качестве несвязывающих контрольных антител.

**Фигура 10 Связывание различных антител к В7Н4 в формате гомодимеров и bsAb с клетками MDA-MB-486 и HCC1954.** Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (гомодимер А), IgG1-B7H4-C2-FEAR (гомодимер В), IgG1-B7H4-C3-FEAR (гомодимер С), IgG1-B7H4-C4-FEAR (гомодимер D), IgG1-B7H4-C5-FEAR (гомодимер Е), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (bsAb А), bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR

[MDA-MB-468] или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR [HCC1954] (bsAb B), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR (bsAb C), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR (bsAb D) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR (bsAb E) определяли с помощью проточной цитометрии. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (bsAb F) или IgG1-b12-K409R (гомодимер F) использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела.

**Фигура 11. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности в клетках SK-BR3 *in vitro* с помощью биспецифических антител к CD3×B7H4 с использованием очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях эффектор-мишень (Е:Т).** bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела. А = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; В = bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; С = bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR.

**Фигура 12. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности в различных линиях опухолевых клеток *in vitro* в присутствии биспецифических антител к CD3×B7H4 с различными плечами к CD3.** bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела. А = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; В = bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR; С = bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, D = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR.

**Фигура 13. Уровни экспрессии B7H4 и IC50 опосредованного Т-клетками киллинга опухолевых клеток.** (А) Количественный анализ с помощью проточной цитометрии уровней экспрессии B7H4 на линиях опухолевых клеток. Показаны отдельные измерения (точки), значения среднего геометрического (столбцы) и стандартное отклонение (планки погрешности). sABC = емкость специфического связывания антител. (В) IC50 опосредованного Т-клетками киллинга опухолевых клеток в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II) для различных линий опухолевых клеток. Каждая точка представляет собой эксперимент, проведенный с отдельным донором Т-клеток (4-6 доноров на клеточную линию), горизонтальные линии указывают медиану. Клеточные линии упорядочены по уровню экспрессии B7H4.

**Фигура 14. Активация Т-клеток биспецифическими антителами к B7H4 в совместных культурах Т-клеток и опухолевых клеток.** (А) Активация Т-клеток (% CD69 на CD8+ клетках) в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II) для различных B7H4-положительных линий опухолевых клеток, определенная с помощью проточной

цитометрии. (B) EC50 активации Т-клеток при использовании Т-клеток, полученных от 3-5 доноров, для каждой из целевых клеточных линий. Каждая точка представляет собой эксперимент, проведенный с отдельным донором Т-клеток; горизонтальные линии обозначают среднее геометрическое.

**Фигура 15. IFN $\gamma$  в супернатанте совместных культур Т-клеток и опухолевых клеток при EC50, EC90 и EC99 для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B) при использовании Т-клеток от 3-4 доноров, определенный с помощью мультиплексного анализа U-plex.** Показаны отдельные измерения (точки), значения среднего геометрического (столбцы) и стандартное отклонение (планки погрешности).

**Фигура 16. Уровни IL-6 и MCP-1 в плазме яванских макаков, получавших однократную дозу в/в инфузии bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B).**

**Фигура 17. Профили средней концентрации в плазме в зависимости от времени после однократной в/в инфузии bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B).**

**Фигура 18. Уровни экспрессии иРНК В7Н4 в ряде первичных солидных опухолей.** Уровни иРНК В7Н4 были извлечены из базы данных Omicsoft TCGA и визуализированы с использованием программного обеспечения Oncoland. Признаки упорядочены в соответствии с медианой экспрессии иРНК В7Н4. THYM = тимома, UVM = увеальная меланома, PCPG = феохромоцитома и параганглиома, ACC = адренкортикальная карцинома, MESO = мезотелиома, SKCM = меланома кожи, READ = аденокарцинома прямой кишки, COAD = аденокарцинома толстой кишки, GMB = мультиформная глиобластома, SARC = саркома, LIHC = гепатоклеточная карцинома печени, LGG = глиома головного мозга нижней степени злокачественности, KIRC = светлоклеточная почечно-клеточная карцинома почек, TGCT = герминогенные опухоли яичка, KICH = хромофобная почка, STAD = аденокарцинома желудка, THCA = карцинома щитовидной железы, HNSC = плоскоклеточная карцинома головы и шеи, PRAD = аденокарцинома предстательной железы, LUAD = аденокарцинома легких, ESCA = карцинома пищевода, CESC = плоскоклеточная карцинома шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома, KIRP = папиллярная почечно-клеточная карцинома почек, UCS = карциносаркома матки, BLCA = уротелиальная карцинома мочевого пузыря, PAAD = аденокарцинома поджелудочной железы, LUSC = плоскоклеточная карцинома легких, BRCA = инвазивная карцинома молочной железы, UCEC = карцинома эндометрия тела матки, OV = серозная цистаденокарцинома яичников и CHOL = холангиокарцинома.

Таблица 1 – Последовательность аминокислот и нуклеиновой кислоты

SEQ ID NO:	Источник	Домен	Последовательность
1	B7H4 человека	ORF	<u>MASLGQILFW</u> SIISIILAGAIALIIGFGISGRHS ITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQ WLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGR TAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTDAGTYKC YIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNA SSETLRCEAPRWFPPQPTVWASQVDQGANF SEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVTINNT YSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLL NSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK
2	Транскрипт 1 B7H4 Macaca fascicularis	ORF	<u>MASLGQILFW</u> SIISIFILAGAIALIIGFGISGRH SITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVI QWLKEGVIGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRG RTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTDAGTYK CYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYN ASSETLRCEAPRWFPPQPTVWASQVDQGAN FSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVTINN TYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQL LNSKASLCVSSFLAISWALLPLAPYLMLK
3	B7H4 Canis familiaris	ORF	<u>MASPGQNI</u> FWSIISVIIIILAGAIALIIGFGISGRH SITVTTLSAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVI QWLKEGVMGLVHEFKEGKDDLSDQDEMFR GRTAVFADQVIGGNASRLKKNVQLTDAGTY KCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSIPEVNVDY NASSENLRCEAPRWFPPQPTVWASQADQGA NFSEVFNTSFELNSENVTMKVVSVLNVTIN NTYSCMIENDIAKATGDIKVTDSEIKRRSHLQ LLNSKASLGVSSFFAISWVLLPLSSYLMLK
4	B7H4 Oryctolagus cuniculus	ORF	<u>MASLGQII</u> FWSIISIILAGAIALIIGFGISGRHSI TVTTLSAGNIGEDGILSCTFEPDIRLSDIVIQ WLKEGVVGLVHEFKEGKDDLSDQDEMFRG RTAVFTDQVIVGNASRLKKNVQLTDAGTYK

			CYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNL DYN ASSESLRCEAPRWFPQPTV V WASQVDQGAN FSEVSNTSFELNSENVTMKVVS VLYNVTVNN TYS CMIENDIAKATGDIKVTDSEIKRRSSLQL LNSRAAPSVSPRS AVGWLLLPLSSYVMLK
5	B7H4 Rattus norvegicus	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINVI I ILAGAIVLIIGFGISGKH</u> FITVTTFTSAGNIGEDGTL SCTFEPDIKLN GIVI QWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRG RTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLTDAGTYT CYIHTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYN ASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGAN FSEVSNTSFELNSENVTMKVVS VLYNVTINN TYS CMIENDIAKATGDIKVTDSEVKRRSQLEL LNSGPSPCVSSVSAAGWALLSLSCCLMLR
6	B7H4 Mus musculus	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINI I ILAGAIALIIGFGISGKH</u> ITVTTFTSAGNIGEDGTL SCTFEPDIKLN GIVI QWLKEGIKGLVHEFKEGKDDLSQQHEMFRG RTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLTDAGTYT CYIRTSKGKGNANLEYKTGAFSMPEINVDYN ASSESLRCEAPRWFPQPTVAWASQVDQGAN FSEVSNTSFELNSENVTMKVVS VLYNVTINN TYS CMIENDIAKATGDIKVTDSEVKRRSQLQ LLNSGPSPCVFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR
7	B7H4 Sus scrofa	ORF	<u>MASLGQVVFWSIISI I ILAGAIAFIIGFGISGRH</u> SITVTTLTSAGNIGEDGIL SCTFEPDIKLS DIVI QWLKEGVTGLVHEFKKGGKDDLSQDEMFR GRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTY KCYIITSKGKGNAKLEYKTGAFSIPEVNVDSN ASSESLRCEAPRWFPQPTV V WASQVDQGAN FSEVSNTSFELNPENVTMKVVS VLYNVTINT TYS CMIENDIAKATGDIRVTDSEIKRQSHLQL LNSKASLCLSSFVAISWVLLPLCPYLMLK
8	Козак		GCCGCCACC
9	B7H3	ORF	<u>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGAL</u> EVQVPEDPVVALVGTDATLCCSF SPEPGFSL

			<p>AQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA  NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFT  CFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPN  KDLRPGDTVITITCSSYQGYPEAEVFWQDGQ  GVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLG  ANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPT  GAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPG  FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGS  YANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEG  SFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLE  PNKDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDG  QGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSLRVV  LGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQP  MTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCW  RKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPL  KHSDSKEDDGQEIA</p>
10	B7H4- IgV/B7H3-IgC	ORF	<p><u>MASLGQILFWSIISIILLAGAIALIIGFGISGRHS</u>  ITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQ  WLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGR  TAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKC  YIITSKGKGNANLEYKTGAPYSKPSMTLEPN  KDLRPGDTVITITCSSYRGYPEAEVFWQDGQ  VPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSLRVVLG  ANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF  PPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIK  QSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHS  DSKEDDGQEIA</p>
11	B7H3- IgV/B7H4-IgC	ORF	<p><u>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGAL</u>  EVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSL  AQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA  NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFT  CFVSIRDFGSAAVSLQVAAFSMPEVNVDYNA  SSETLRCEAPRWFQPTVWASQVDQGANF  SEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNT  YSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLL</p>

			NSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK
12	B7H4ECD-FcHisC	Зрелый белок	LIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTF EPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDEL SEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNV QLTDAGTYKCYIITSKGGKGNANLEYKTGAFS MPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVW ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVS VLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESE IKRRSHLQLLNSKASIEGRMDPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTAPPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKHHHHHHHHEPEA
13	Зрелая CD3ε (эпсилон) человека	Зрелый белок	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP GSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSL KEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR ARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLL LVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQ NKERPPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRR
14	b12_VH	VH	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFS</u> <u>NFVIHWVRQAPGQRFQWGMWINPYNGNKEF</u> SAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADT AVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGK GTTVIVSS
15	b12_VL	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSH <u>SIRSRR</u> VAWYQHKGPGQAPRLVIH <u>GVSN</u> RASGISDRFS GSGSGTDFLTITRVEPEDFALYYC <u>QVYGASS</u> <u>YTFGQG</u> TKLERK
16	VH_huCD3-H1L1	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFNT</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT</u> YYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE

			DTAMYYC <u>VRHGNFGNSYVSWFAY</u> WGQGTL VTVSS
17	VH_huCD3- H1L1-H101G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFNT</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT</u> YYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYC <u>VRGGNFGNSYVSWFAY</u> WGQGTL VTVSS
18	VH_huCD3- H1L1_CDR1	VH_CDR1	GFTFNTYA
19	VH_huCD3- H1L1_CDR2	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
20	VH_huCD3- H1L1_CDR3	VH_CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
21	VH_huCD3- H1L1- H101G_CDR3	VH_CDR3	VRGGNFGNSYVSWFAY
22	VL_huCD3- H1L1	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSST <u>GAVTTS</u> <u>NYANWVQQT</u> PGQAFRGLIG <u>TNKR</u> APGVPA RFSGLIGDKAALTITGAQADDESIYFC <u>ALWY</u> <u>SNLWV</u> FGGGTKLTVL
23	VL_huCD3- H1L1_CDR1	VL_CDR1	TGAVTTSNY
	VL_huCD3- H1L1_CDR2	VL_CDR2	GTN
24	VL_huCD3- H1L1_CDR3	VL_CDR3	ALWYSNLWV
25	VH_B7H4-C1	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GG</u> SFS <u>GY</u> YWSWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHSG</u> STNYNP SLKSRVTISIDTSKNQFSLKLTSTVTAADTAVF Y <u>CARGLFNWNFDS</u> WGQGTLVTVSS
26	VH_B7H4- C1_CDR1	VH_CDR1	GGSFSGYY
27	VH_B7H4- C1_CDR2	VH_CDR2	INHSGST

28	VH_B7H4-C1_CDR3	VH_CDR3	ARGLFNWNFDS
29	VH_B7H4-C1-N52S	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSEFS GYYWSWIRQPPGKGLEWIGEISHSGSTNYNP SLKSRVTISIDTSKNQFSLKLTSTVAADTAVF YCARGLFNWNFDSWGQGTLVTVSS
30	VH_B7H4-C1-N52S_CDR2	VH_CDR2	ISHSGST
31	VH_B7H4-C1-N52Q	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSEFS GYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGSTNYNP SLKSRVTISIDTSKNQFSLKLTSTVAADTAVF YCARGLFNWNFDSWGQGTLVTVSS
32	VH_B7H4-C1-N52Q_CDR2	VH_CDR2	IQHSGST
33	VL_B7H4-C1	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRND LGWYQQKPGKAPKRLIYGASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYP RTFGQGTVEIK
34	VL_B7H4-C1_CDR1	VL_CDR1	QGIRND
	VL_B7H4-C1_CDR2	VL_CDR2	GAS
35	VL_B7H4-C1_CDR3	VL_CDR3	LQHNSYPRT
36	VH_B7H4-C3	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT NFWIHWVRQAPGGLEWIGEIDPSDSYTNYP QKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDYAV YYCAREITTVDYWGQGTLVTVSS
37	VH_B7H4-C3_CDR1	VH_CDR1	GYTFTNFW
38	VH_B7H4-C3_CDR2	VH_CDR2	IDPSDSYT
39	VH_B7H4-C3_CDR3	VH_CDR3	AREITTVDY

40	VL_B7H4-C3	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAT <u>SSISY</u> HWYQQKPGKAPKGWYD <u>TSKLA</u> HGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCH <u>QRRSYP</u> <u>FTFGQGTKVEIK</u>
41	VL_B7H4- C3_CDR1	VL_CDR1	SSISY
	VL_B7H4- C3_CDR2	VL_CDR2	DTS
42	VL_B7H4- C3_CDR3	VL_CDR3	HQRRSYPFT
43	VH_B7H4-C2	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFT</u> <u>SYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNY</u> NEKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTA VYYC <u>ARLDGSSYRGAMDS</u> WGQGTLLTVSS
44	VH_B7H4- C2_CDR1	VH_CDR1	GYTFTSYW
45	VH_B7H4- C2_CDR2	VH_CDR2	IYPGGGYT
46	VH_B7H4- C2_CDR3	VH_CDR3	ARLDGSSYRGAMDS
47	VL_B7H4-C2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS <u>QGFNK</u> <u>YVAWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLQPGVPSRF</u> SGSGSGRDYTLTISLQPEDFATYYC <u>LQYGNL</u> <u>LYAFGQGTKVEIK</u>
48	VL_B7H4- C2_CDR1	VL_CDR1	QGFNKY
	VL_B7H4- C2_CDR2	VL_CDR2	YTS
49	VL_B7H4- C2_CDR3	VL_CDR3	LQYGNLLYA
50	VH_B7H4-C4	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLS <u>CAASGFTVSSN</u> <u>YMNWVRQAPGKGLEWVSVIYGSGR</u> TYAD SVKGRVTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYC <u>ARDTYAMDVWGQGT</u> TVTVSS

51	VH_B7H4- C4_CDR1	VH_CDR1	GFTVSSNY
52	VH_B7H4- C4_CDR2	VH_CDR2	IYGSGRT
53	VH_B7H4- C4_CDR3	VH_CDR3	ARDTYAMDV
54	VL_B7H4-C4	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRATGIPDRFS</u> GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSP</u> <u>MYTFGQG</u> TKLEIK
55	VL_B7H4- C4_CDR1	VL_CDR1	QSVSSSY
	VL_B7H4- C4_CDR2	VL_CDR2	GAS
56	VL_B7H4- C4_CDR3	VL_CDR3	QQYGSSPMYT
57	IgG1-Fc	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	IgG1- Fc_F405L	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

			TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	IgG1-Fc_FEA	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	IgG1- Fc_FEAL	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1- Fc_FEAR	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP

			VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	IgG1- Fc_K409R	Константная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	Каппа	Константная	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
64	Лямбда	Константная	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
65	VH_B7H4-C5	VH	QLQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSG <u>SY YWGWIRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNP</u> SLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCAREGSYPNQFDPWGQGT LVTVSS
66	VH_B7H4- C5_CDR1	VH_CDR1	GGSIKSGSY Y
67	VH_B7H4- C5_CDR2	VH_CDR2	IYYSGST
68	VH_B7H4- C5_CDR3	VH_CDR3	AREGSYPNQFDP
69	VL_B7H4-C5	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYHSEF

			<u>FTFGGGTKVEIK</u>
70	VL_B7H4- C5_CDR1	VL_CDR1	QSVSSN
	VL_B7H4- C5_CDR2	VL_CDR2	GAS
71	VL_B7H4- C5_CDR3	VL_CDR3	QQYHSFPFT

Приведенные выше в таблице области CDR (CDR1, CDR2 и CDR3 и подчеркнутые последовательности в последовательностях VH и VL) аннотированы в соответствии с IMGT (смотри документы Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999, и Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). Ссылки на K405L и K409R, используемые в таблице выше, соответствуют Eu-индексу нумерации (описан в документе Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, стр. 662680689 (1991)).

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

#### **Определения**

Термин «антитело» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения иммуноглобулиновой молекулы, фрагмента иммуноглобулиновой молекулы или производного любого из них, которые характеризуются способностью специфически связываться с антигеном при типичных физиологических и/или специфических для опухолей условиях, с временем полужизни, составляющим значительный период времени, такой как по меньшей мере около 30 минут, по меньшей мере около 45 минут, по меньшей мере около одного часа, по меньшей мере около двух часов, по меньшей мере около четырех часов, по меньшей мере около 8 часов, по меньшей мере около 12 часов, по меньшей мере около 24 часов или более, по меньшей мере около 48 часов или более, по меньшей мере около 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и так далее, или любой другой соответствующий функционально определенный период (такой как время, достаточное для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для интернализации антитела). Антитело содержит область связывания (или домен связывания, как можно использовать в настоящем документе, оба термина имеют одно и то же значение), которая может взаимодействовать с антигеном, причем область связывания содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулиновой

молекулы, или аналогичную область. Антитела могут содержать константные области антител (Ab), которые могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторские клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации комплемента.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает моноклональное антитело (mAb), антителоподобный полипептид, химерное антитело, гуманизированное антитело, а также «фрагмент антитела», или «его фрагмент», сохраняющий способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающий фрагмент), получаемые любым известным методом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и технология рекомбинантной ДНК. Термин «антитело» включает биспецифические антитела и/или антитела, содержащие дополнительные модификации, например их конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Антитело, как определено в соответствии с настоящим изобретением, может иметь любой изотип, если настоящее раскрытие не ограничено иным образом.

Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примерами связывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», служат (i) Fab' или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов переменного домена легкой цепи (VL), переменного домена тяжелой цепи (VH), константной области легкой цепи (CL) и домена 1 константной области тяжелой цепи (CH1), или моновалентное антитело, как описано в документе WO 2007/059782; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент, Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом, Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90; (vi) антитела верблюдовых или нанотела, Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1):111-24, и (vii) выделенная определяющая комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных способов синтетическим линкером, что позволит создать из них единую белковую цепь, в которой области VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv), смотри, например, документы Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1):111-24 и Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином

антитело, если иное не установлено или явно не указано контекстом. Хотя такие фрагменты обычно включают в понятие антитела, они все вместе и каждый независимо являются уникальными признаками настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения рассмотрены в настоящем документе далее.

Антитело может быть получено и собрано из различных систем экспрессии или продуцирования *in vitro* или *ex vivo*, например из рекомбинантно модифицированных клеток-хозяев, из гибридом или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающих транскрипцию и/или трансляцию последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело, *in vitro*. Следует понимать, что множество различных антител, где антитела определены в контексте настоящего изобретения, может быть получено путем получения каждого антитела отдельно в системе продуцирования, как указано выше, и последующего смешивания антител или путем получения нескольких антител в одной и той же системе продуцирования.

Термин «иммуноглобулиновая тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно называемой в настоящем документе VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно называемой в настоящем документе CH), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Термин «иммуноглобулин» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения класса структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей с низкой молекулярной массой и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре потенциально соединены между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена (смотри, например, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). В структуре иммуноглобулина две тяжелые цепи соединены между собой посредством дисульфидных связей в так называемой «шарнирной области». Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь обычно состоит из нескольких областей; переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в настоящем документе VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Кроме того, области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые определяющими комплементарность областями

(complementarity determining region, CDR), перемежающимися с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями (framework region, FR). Каждая VH и VL обычно состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

При использовании в настоящем документе термины «полумолекула», «Fab-плечо» и «плечо» относятся к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь. Когда описывается, что биспецифическое антитело содержит полумолекулу антитела, «происходящую от» первого антитела, и полумолекулу антитела «происходящую от» второго антитела, термин «происходящий от» означает, что биспецифическое антитело было получено путем рекомбинации любым известным способом указанных полумолекул от каждого из указанных первого и второго антител в итоговое биспецифическое антитело. В этом контексте «рекомбинация» не ограничена каким-либо конкретным способом рекомбинации и, следовательно, предусматривает все способы получения биспецифических антител, описанных в настоящем документе ниже, включая, например, рекомбинацию путем обмена полумолекул, а также рекомбинацию на уровне нуклеиновой кислоты и/или за счет совместной экспрессии двух полумолекул в одних и тех же клетках.

Термин «антигенсвязывающая область» или «область связывания» при использовании в настоящем документе относится к области антитела, которая способна связываться с антигеном. Антиген может представлять собой любую молекулу, такую как полипептид. Антигены могут, например, быть представлены на клетке, бактерии или вирионе. Термины «антиген» и «мишень» можно, если это не противоречит контексту, в контексте настоящего изобретения использовать взаимозаменяемо. Термины «антигенсвязывающая область» и «антигенсвязывающий сайт» можно, если это не противоречит контексту, в контексте настоящего изобретения использовать взаимозаменяемо.

Термины «блокирует связывание», или «блокирование связывания антитела», или «перекрестное блокирование связывания» или «перекрестно блокирует связывание» относятся к ситуации, когда одно антитело, связанное со специфическим антигеном, предотвращает связывание второго антитела с тем же самым антигеном и наоборот. В отсутствие другого антитела каждое антитело обладает способностью связываться с антигеном, что определяется значительным ответом на связывание, тогда как у одного из антител отсутствует ответ на связывание, когда присутствует другое антитело. Способность одного антитела блокировать связывание другого антитела может быть определена с помощью биослойной интерферометрии в классическом формате сэндвич-анализа связывания эпитопов, например, как описано в примере 5 настоящей заявки и Abdiche et al.

(Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. *Anal Biochem.* 2009; 386(2): 172-180). В кратком изложении, в сэндвич-анализе связывания эпитопов антител в растворе тестируют на связывание со своим специфическим антигеном, который сначала захватывается иммобилизованным антителом. В контексте настоящего изобретения одно антитело не блокирует связывание второго антитела, если оно способно связываться с антигеном в присутствии второго антитела, и наоборот. Термины «блокирует связывание», и «блокирование связывания антитела», и «перекрестное блокирование связывания», и «перекрестно блокирует связывание» можно, если это не противоречит контексту, в контексте настоящего изобретения использовать взаимозаменяемо. Можно также сказать, что антитело, о котором говорят, что оно блокирует связывание другого антитела, конкурирует с другим антителом за связывание с мишенью.

Термин « $K_D$ » (M) при использовании в настоящем документе относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, и ее получают путем деления  $k_d$  на  $k_a$ .  $K_D$  также может называться «аффинностью связывания».

Термин « $k_d$ » ( $s^{-1}$ ) при использовании в настоящем документе относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением  $k_{off}$  или скоростью распада.

Термин « $k_a$ » ( $M^{-1} \times s^{-1}$ ) при использовании в настоящем документе относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением  $k_{on}$  или скоростью образования.

Термин «связывание» при использовании в настоящем документе относится к связыванию антитела с заранее определенным антигеном или мишенью, обычно с аффинностью связывания, соответствующей  $K_D$ , равной  $1E^{-6}$  M или меньше, например  $5E^{-7}$  M или меньше,  $1E^{-7}$  M или меньше, такой как  $5E^{-8}$  M или меньше, такой как  $1E^{-8}$  M или меньше, такой как  $5E^{-9}$  M или меньше или такой как  $1E^{-9}$  M или меньше, при определении с помощью биослойной интерферометрии с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, соответствующей  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз меньше, например по меньшей мере в 100 раз меньше, например по меньшей мере в 1000 раз меньше, например по меньшей мере в 10000 раз меньше, например по меньшей мере в 100000 раз меньше, чем его аффинность при связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличающимся от заранее определенного антигена или близкородственного антигена.

Термин «В7Н4» при использовании в настоящем документе относится к белку, названному В7Н4, который также обозначается как В7-Н4; домен V-set, содержащий ингибитор-1 активации Т-клеток; или VTCN1. В7Н4 является членом семейства белков В7, которое содержит белковые лиганды клеточной поверхности, которые связываются с рецепторами на лимфоцитах. В7Н4 представляет собой трансмембранный белок типа I, который включает в себя короткий внутриклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и внеклеточный домен с IgV- и IgC-подобным доменом с четырьмя консервативными остатками цистеина и семью сайтами для N-связанного гликозилирования. (Sica et al., 2003, Immunity 18: 849-861). Белки В7Н4 известны у различных видов, например В7Н4 человека (*Homo sapiens*) (номер доступа в Uniprot Q7Z7D3), транскрипт 1 В7Н4 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (номер доступа в Uniprot A0A2K5U6P5), В7Н4 собаки (*Canis familiaris*) (номер доступа в Uniprot F1P8R9), В7Н4 кролика (*Oryctolagus cuniculus*) (номер доступа в Uniprot G1TQE8), В7Н4 крысы (*Rattus norvegicus*) (номер доступа в Uniprot Q501W4), В7Н4 мыши (*Mus musculus*) (номер доступа в Uniprot Q7TSP5) и В7Н4 свиньи (*Sus scrofa*) (номер доступа в Uniprot F1SAY4). Могут существовать природные варианты перечисленных последовательностей В7Н4.

Термин «CD3» при использовании в настоящем документе относится к человеческому белку кластера дифференцировки 3, который является частью корцепторного белкового комплекса Т-клеток и состоит из четырех отдельных цепей. CD3 обнаружен у различных видов, и, следовательно, термин «CD3» может не быть ограничен человеческим CD3, если это не противоречит контексту. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$  (гамма) (цепь CD3 $\gamma$  человека, номер P09693 в UniProtKB/Swiss-Prot, или CD3 $\gamma$  яванского макака, номер Q95LI7 в UniProtKB/Swiss-Prot), цепь CD3 $\delta$  (дельта) (CD3 $\delta$  человека, номер P04234 в UniProtKB/Swiss-Prot, или CD3 $\delta$  яванского макака, номер Q95LI8 в UniProtKB/Swiss-Prot), две цепи CD3 $\epsilon$  (эпсилон) (CD3 $\epsilon$  человека: номер P07766 в UniProtKB/Swiss-Prot, последовательность которой включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 13, в которой аминокислотные остатки 1-22 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 23-207 представляют собой зрелый полипептид CD3 $\epsilon$ ; CD3 $\epsilon$  яванского макака, номер Q95LI5 в UniProtKB/Swiss-Prot; или CD3 $\epsilon$  макака-резуса, номер G7NCB9 в UniProtKB/Swiss-Prot) и цепь CD3 $\zeta$  (дзета) (CD3 $\zeta$  человека, номер P20963 в UniProtKB/Swiss-Prot, CD3 $\zeta$  яванского макака, номер Q09TK0 в UniProtKB/Swiss-Prot). Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (T cell receptor, TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

Термин «антителосвязывающая область» относится к области антигена, которая содержит эпитоп, с которым связывается антитело. Антителосвязывающая область может быть определена с помощью связывания эпитопов с использованием биослойной интерферометрии, с помощью аланинового сканирования или с помощью анализов перестановки доменов (используя антигенные конструкции, в которых области антигена заменены областями другого вида, и определяя, продолжает ли антитело связываться с антигеном или нет). Аминокислоты внутри антителосвязывающей области, которые участвуют во взаимодействии с антителом, могут быть определены с помощью масс-спектрометрии с обменом водорода/дейтерия и/или с помощью кристаллографии антитела, связанного со своим антигеном.

Термин «эпитоп» означает антигенную детерминанту, которая специфически связывается антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно имеют определенные характеристики трехмерной структуры, а также определенные характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или покрываются антителом, когда оно связано с антигеном (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри или в непосредственной близости от области узнавания специфического антитела).

Термины «моноклональное антитело», «моноклональное Ab», «композиция моноклонального антитела», «mAb» или аналогичные термины при использовании в настоящем документе относятся к препарату молекул антител одного молекулярного состава, который обычно демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Моноклональное антитело обычно может быть получено из идентичных клеток, которые все являются клонами уникальной родительской клетки, таких как, например, гибридомы, стабильные клеточные линии или аналогичные клетки. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, проявляющим одну специфичность связывания, которые содержат переменные и константные области, происходящие от последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. Человеческие моноклональные антитела могут быть продуцированы гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь,

имеющая геном, содержащий человеческие трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитые с иммортализованной клеткой. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены из человеческих В-клеток или плазматических клеток. Моноклональные антитела также могут быть получены из рекомбинантно модифицированных клеток-хозяев или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающих транскрипцию и/или трансляцию последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело, *in vitro*.

Термин «изотип» при использовании в настоящем документе относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любым его аллотипам, таким как IgG1m(za) и IgG1m(f), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать с легкой цепью каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ).

Термин «полноразмерное антитело» при использовании в настоящем документе относится к антителу (например, родительскому антителу или варианту антитела), содержащему одну пару тяжелой и легкой цепей или две разные пары тяжелой и легкой цепей, причем каждая пара содержит константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей, обычно обнаруживаемые в паре тяжелая цепь-легкая цепь антитела дикого типа этого изотипа. В полноразмерном варианте антитела константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей могут, в частности, содержать аминокислотные замены, которые модифицируют и/или улучшают функциональные свойства антитела по сравнению с полноразмерным родительским антителом или антителом дикого типа. Полноразмерное антитело в соответствии с настоящим изобретением может быть получено с помощью способа, предусматривающего стадии (i) клонирования последовательностей CDR в один или несколько подходящих векторов, содержащих полные последовательности тяжелой и легкой цепей, и (ii) экспрессии полученных подходящих векторов с последовательностями тяжелой и легкой цепей в подходящих системах экспрессии. Специалисту в данной области техники известно, как получать полноразмерное антитело, исходя или из последовательностей CDR, или из полных последовательностей переменных областей. Таким образом, специалисту в данной области техники известно, как получать полноразмерное антитело в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «гуманизированное антитело» при использовании в настоящем документе относится к генно-инженерному антителу отличного от человека вида, которое содержит константные домены человеческого антитела и переменные домены отличного от человека вида, модифицированные так, чтобы они имели высокий уровень гомологии последовательностей с человеческими переменными доменами. Этого можно достичь

путем трансплантации определяющих комплементарность областей (CDR) антитела отличного от человека вида, которые вместе образуют антигенсвязывающий сайт, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (смотри, в частности, документы WO92/22653 и EP0629240). Для того чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность родительского антитела, может потребоваться помещение каркасных остатков из родительского антитела (то есть антитела отличного от человека вида) в человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может содержать последовательности CDR отличного от человека вида, причем в большинстве случаев человеческие каркасные области, необязательно, содержат обратные мутации одной или нескольких аминокислот в аминокислотную последовательность отличного от человека вида, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные модификации аминокислот, которые не обязательно являются обратными мутациями, могут быть применены для получения гуманизованного антитела с такими предпочтительными характеристиками, как, особенно полезные, аффинность и биохимические свойства, например для включения модификаций для предотвращения дезамидирования, обеспечения «инертной Fc-области» и/или улучшения получения.

Термин «человеческое антитело» при использовании в настоящем документе предназначен для включения антител, содержащих переменные и каркасные области, происходящие от последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина, и константный домен, происходящий от константного домена человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевого типа человеческого иммуноглобулина (например, мутации, вставки или делеции, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). «Человеческое антитело» может включать последовательности VH и VL, которые были получены из последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина у человека, у трансгенного животного, такого как описанные в примерах в настоящем документе, мыши HIS и аналогичных организмов. Такие последовательности VH и VL считаются человеческими последовательностями VH и VL, которые, например, слиты с константными доменами, происходящими от константного домена человеческого иммуноглобулина.

Следовательно, «человеческие антитела» могут представлять собой сконструированные антитела. «Человеческое антитело» может быть подвергнуто дальнейшему конструированию, например, может содержать модификации для предотвращения дезамидирования, обеспечения «инертной Fc-области», обеспечения создания биспецифических антител и/или улучшения получения. Человеческое антитело также можно продуцировать в клетках отличного от человека вида, например в клетках СНО или аналогичных клетках. Однако термин «человеческое антитело» при использовании в настоящем документе не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие от зародышевой линии другого отличного от человека вида, такого как мышь, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности.

Термин «Fc-область» при использовании в настоящем документе относится к области, содержащей в направлении от N- к C-терминальному концу двух тяжелых цепей антитела по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и область CH3. Fc-область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

Термин «шарнирная область» при использовании в настоящем документе относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 в соответствии с нумерацией Eu, как изложено в документе Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, стр. 662680689 (1991). Однако шарнирная область также может относиться к любому из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «область CH1» или «домен CH1» при использовании в настоящем документе относится к области CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область CH1 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 118-215 в соответствии с нумерацией Eu, как изложено Kabat (там же). Однако область CH1 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «область CH2» или «домен CH2» при использовании в настоящем документе относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область CH2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 в соответствии с нумерацией Eu, как изложено Kabat (там же). Однако область CH2 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «область СНЗ» или «домен СНЗ» при использовании в настоящем документе относится к области СНЗ тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область СНЗ человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 в соответствии с нумерацией Eu, как изложено Kabat (там же). Однако область СНЗ также может относиться к любому из других подтипов, как описано в настоящем документе.

Термин «Fc-опосредованные эффекторные функции» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью или антигеном на клеточной мембране, причем Fc-опосредованная эффекторная функция связана с Fc-областью полипептида или антитела. Примерами Fc-опосредованных эффекторных функций служат (i) связывание C1q, (ii) активация комплемента, (iii) комплементзависимая цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), (v) связывание Fc-гамма-рецептора (FcγR), (vi) антителозависимое FcγR-опосредованное сшивание антигена, (vii) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (viii) комплементзависимая клеточная цитотоксичность (CDCC), (ix) усиленная комплементом цитотоксичность, (x) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредованное антителом, (xi) опсонизация и (xii) комбинация любых пунктов (i)-(xi).

Термины «инертность», «инертный» или «неактивирующий» при использовании в настоящем документе относятся к Fc-области, которая по меньшей мере не способна связывать никакой FcγR, индуцировать Fc-опосредованное сшивание FcγR или индуцировать FcγR-опосредованное сшивание антигенов-мишеней посредством двух Fc-областей отдельных антител, или не способна связывать C1q. Примером этого являются замены FEA в константном домене, как описано в настоящем документе. Инертность Fc-области антитела можно тестировать с использованием антитела в моноспецифическом или биспецифическом формате.

Термин «полноразмерное» при использовании в контексте антитела указывает на то, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены, соответствующие конкретному изотипу, такие как те, которые обычно встречаются для этого изотипа в природе, например домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнирный, VL и CL для антитела IgG1.

Термин «моновалентное антитело» в контексте настоящего изобретения относится к молекуле антитела, которая может взаимодействовать с антигеном только с помощью одного антигенсвязывающего домена (например, одного Fab-плеча). В контексте биспецифического антитела «моновалентное связывание антитела» относится к связыванию биспецифического антитела с одним антигеном с помощью только одного антигенсвязывающего домена (например, одного Fab-плеча).

Термин «моноспецифическое антитело» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, которое характеризуется специфичностью связывания только с одним антигеном, одним эпитопом. Антитело может представлять собой моноспецифическое моновалентное антитело (то есть нести только одну антигенсвязывающую область) или моноспецифическое бивалентное антитело (например, антитело с двумя идентичными антигенсвязывающими областями).

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, содержащему два антигенсвязывающих домена, которые связывают различные эпитопы, например две неидентичные пары областей VH и VL, два неидентичных Fab-плеча или два Fab-плеча с неидентичными областями CDR. В контексте настоящего изобретения биспецифические антитела характеризуются специфичностью к по меньшей мере двум различным эпитопам. Такие эпитопы могут находиться на одинаковых или на различных антигенах или мишенях. Если эпитопы находятся на различных антигенах, такие антигены могут находиться на одной и той же клетке или на различных клетках, типах клеток или структурах, таких как внеклеточный матрикс или везикулы и растворимый белок. Биспецифическое антитело может, таким образом, быть способно сшивать несколько антигенов, например две различные клетки.

Термин «бивалентное антитело» относится к антителу, которое содержит две антигенсвязывающие области, которые связываются с двумя одинаковыми эпитопами двух одинаковых антигенов или связывается с двумя различными эпитопами на одинаковых или различных антигенах. Следовательно, бивалентное антитело может представлять собой моноспецифическое антитело или биспецифическое антитело.

Термин «аминокислота» и «аминокислотный остаток» можно в настоящем документе использовать взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты представляет собой органические соединения, содержащие функциональные аминогруппу ( $-NH_2$ ) и карбоксильную ( $-COOH$ ) группы, а также боковую цепь (группу R), специфичную для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты можно классифицировать на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или двух из следующих таблиц:

Основная классификация, основанная на строении и общей химической характеристике группы R

Таблица 2

Класс	Аминокислота
Кислые остатки	D и E

Основные остатки	K, R и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Таблица 3

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Класс	Аминокислота
Остатки, содержащие гидроксильную группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Ассоциированные с циклоалкенилом остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в формировании изгиба	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Замену одной аминокислоты на другую можно классифицировать как консервативную или неконсервативную замену. В контексте настоящего изобретения «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту с аналогичными структурными и/или химическими характеристиками, такую замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток того же класса, как определено в любой из двух таблиц выше: например, лейцин может быть заменен изолейцином, поскольку они оба являются алифатическими разветвленными гидрофобными. Аналогично, аспарагиновая кислота может быть заменена на глутаминовую кислоту, поскольку обе они представляют собой небольшие отрицательно заряженные остатки.

В контексте настоящего изобретения замену в антители обозначают:

Исходная аминокислота – положение – замененная аминокислота;

Что касается общепризнанной номенклатуры аминокислот, используется трехбуквенный или однобуквенный код, включая коды «Хаа» или «Х» для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, Хаа или Х обычно могут представлять собой любую из 20 встречающихся в природе аминокислот. Термин «встречающийся в природе» при использовании в настоящем документе относится к любому из следующих аминокислотных остатков; глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин, триптофан, фенилаланин, тирозин, метионин и цистеин.

Соответственно, обозначение «K409R» или «Lys409Arg» означает, что антитело содержит замену лизина на аргинин в аминокислотном положении 409. Замена аминокислоты в данном положении на любую другую аминокислоту обозначается: Исходная аминокислота – положение; или, например, «K409». Для модификации, в которой исходная(ые) аминокислота(ы) и/или замененная(ые) аминокислота(ы) могут содержать более чем одну, но не все аминокислоты, эти более чем одна аминокислота могут быть разделены «,» или «/». Например, замена лизина на аргинин, аланин или фенилаланин в положении 409: «Lys409Arg,Ala,Phe», или «Lys409Arg/Ala/Phe», или «K409R,A,F», или «K409R/A/F», или «K409 на R, A или F». Такие обозначения могут использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения, но имеют одни и те же значение и смысл.

Кроме того, термин «замена» охватывает замену на любую из других девятнадцати природных аминокислот или на другие аминокислоты, такие как неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты К в положении 409 включает каждую из следующих замен: 409А, 409С, 409D, 409Е, 409F, 409G, 409Н, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409Т, 409V, 409W, 409Р и 409У. Это, кстати, эквивалентно обозначению 409Х, где Х обозначает любую аминокислоту, отличную от исходной аминокислоты. Эти замены также могут быть обозначены K409A, K409C и так далее. Или K409A,C и так далее. Или K409A/C/ и так далее. То же самое применимо по аналогии ко всем без исключения положениям, указанным в настоящем документе, для конкретного включения в настоящий документ любой из таких замен.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением может также содержать удаление аминокислотного остатка. Такое удаление может быть обозначено «del» и предусматривает, например, запись в виде K409del. Таким образом, в случае таких вариантов осуществления лизин в положении 409 удален из аминокислотной последовательности.

Термин «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения клетки, в которую была введена нуклеиновая кислота, такая как вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но также могут охватывать потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все же включается в объем термина «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе. К рекомбинантным клеткам-хозяевам относятся, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK-293, клетки Expi293F, клетки PER.C6, клетки NS0 и лимфоцитарные клетки, и прокариотические клетки, такие как *E. coli*, и другие эукариотические хозяева, такие как растительные клетки и грибы.

Термин «трансфектома» при использовании в настоящем документе включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело или антиген-мишень, такие как клетки CHO, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки HEK-293, клетки Expi293F, растительные клетки или грибы, включая дрожжевые клетки.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяют по длине эталонной последовательности с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Использовали параметры штраф за открытие гэпа 10, штраф за расширение гэпа 0,5 и матрицу замен EBLOSUM62 (версия BLOSUM62 из EMBOSS). Выходные данные Needle, помеченные как «самая большая идентичность» (полученные с использованием опции -nobrief), используют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{Общее количество гэпов в выравнивании})$ .

Сохранение сходных остатков также или альтернативно может быть измерено с помощью показателя сходства, определенного с помощью программы BLAST (например, BLAST 2.2.8, доступной через NCBI, с использованием стандартных настроек BLOSUM62, открытие гэпа=11 и расширение гэпа=1). Подходящие варианты обычно демонстрируют сходство по меньшей мере около 45%, такое как по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 85%, по меньшей

мере около 90%, по меньшей мере около 95% или больше (например, около 99%) с родительской эталонной последовательностью.

Термины «интернализированный» или «интернализация» при использовании в настоящем документе относятся к биологическому процессу, при котором молекулы, такие как антитело в соответствии с настоящим изобретением, поглощаются клеточной мембраной и втягиваются внутрь клетки. Интернализация может также называться «эндоцитозом».

### **Фармацевтические композиции и единичные лекарственные формы, содержащие биспецифические антитела, нацеленные на CD3×B7H4**

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, содержащие антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные антигенсвязывающие области представляют собой человеческие переменные области и/или гуманизированные переменные области. Например, одна антигенсвязывающая область может содержать человеческие переменные области тяжелой и легкой цепей, а другая антигенсвязывающая область может содержать гуманизированные переменные области тяжелой и легкой цепей. Или обе антигенсвязывающие области могут содержать человеческие переменные области тяжелой и легкой цепей, или обе антигенсвязывающие области могут содержать гуманизированные переменные области тяжелой и легкой цепей. Следовательно, соответственно, предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, содержащие антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей содержат человеческие каркасные области. Антитело в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, также может называться в настоящем документе, например, антителом к CD3×B7H4.

Такие антитела представляют собой, предпочтительно, биспецифические антитела. Такое антитело, как описано выше в другом варианте осуществления, способно связывать раковые клетки и Т-клетки, как, например, описано в примерах. Раковые клетки, которые

могут быть выбраны, представляют собой раковые клетки, которые экспрессируют человеческий В7Н4, и/или представляют собой раковые клетки из солидной опухоли. Такое антитело, предпочтительно, способно индуцировать опосредованный Т-клетками клеточный киллинг раковых клеток.

Под способностью к связыванию понимается, как показано в примерах, что в анализе связывания антитело связывается со своей мишенью, как показано, например, с помощью типичных кривых связывания, таких как показанные на фигурах 3 и 4 в настоящем документе, или с помощью определения аффинности связывания с использованием, например, биослойной интерферометрии, как показано в примерах 3 и 4. Антигенсвязывающая область, не способная связываться с определенной мишенью, характеризуется, например, неопределяемой аффинностью связывания со своей мишенью, например при ответе  $<0,05$  нм при самой высокой концентрации, используемой в типичном анализе с помощью биослойной интерферометрии, таком как показанный в примере 3. В любом случае специалист в данной области техники хорошо знает, как определять, способна ли антигенсвязывающая область связываться со своей мишенью или нет.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

а) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, и

б) буферное средство,

причем рН данной композиции составляет от 4,0 до 8,0.

Предпочтительно, чтобы рН составлял от 4,5 до 6,5. Согласно предпочтительному варианту осуществления рН композиции составляет от 5,0 до 6,5. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления рН композиции составляет от 5,0 до 6,0. Было обнаружено, что эти диапазоны рН приводят к особенно высокой стабильности антитела, в частности к термической стабильности. Кроме того, в диапазоне рН согласно настоящему изобретению фармацевтические композиции обеспечивают высокую степень растворимости антитела.

Согласно предпочтительному варианту осуществления буферное средство выбрано из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит с) неионогенное вспомогательное вещество.

Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество представляет собой сахар или сахарный спирт.

Согласно варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество выбрано из сорбита, сахарозы или их смесей. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество представляет собой сорбит.

Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество присутствует в концентрации от 100 до 300 мМ, такой как 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество представляет собой сорбит, и он присутствует в концентрации 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит d) поверхностно-активное вещество.

Согласно некоторым вариантам осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из моноолеата глицерина, хлорида бензетония, докузата натрия, фосфолипидов, алкиловых эфиров полиэтилена, лаурилсульфата натрия и трикаприлина, хлорида бензалкония, цетримида, хлорида цетилпиридиния и фосфолипидов, альфа-токоферола, моноолеата глицерина, миристилового спирта, фосфолипидов, полочсамеров, алкиловых эфиров полиоксиэтилена, производных полиоксиэтиленового касторового масла, полиоксиэтиленовых эфиров сорбита и жирных кислот, полиоксиэтиленстеаратов, полиоксилгидроксистеарата, полиоксиглицеридов, полисорбатов, дилаурата пропиленгликоля, монолаурата пропиленгликоля, сложных эфиров сорбита, пальмитата сахарозы, стеарата сахарозы, трикаприлина и TPGS и их смесей.

Согласно одному варианту осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 или 80. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,005% до 0,4% вес/об, например от около 0,01 до 0,1% вес/об, например от около 0,01 до 0,09% вес/об, например от около 0,01 до 0,06% вес/об, например от около 0,01 до 0,05% вес/об, например 0,02% вес/об, или 0,03% вес/об, или 0,04% вес/об, или 0,05% вес/об, предпочтительно 0,02% вес/об. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, и он присутствует в фармацевтическом составе в количестве от 0,02% вес/об до 0,04 вес/об. Предпочтительно, оно составляет 0,02% вес/об.

Согласно предпочтительному варианту осуществления концентрация антитела составляет от 0,5 до 100 мг/мл, например от 1,0 до 50 мг/мл или например от 5 до 30 мг/мл, например 5 мг/мл, или 6 мг/мл, или 7 мг/мл, или 8 мг/мл, или 9 мг/мл, или 10 мг/мл, или 11 мг/мл, или 12 мг/мл, или 13 мг/мл, или 14 мг/мл, или 15 мг/мл, или 16 мг/мл, или 17 мг/мл, или 18 мг/мл, или 19 мг/мл, или 20 мг/мл, или 21 мг/мл, или 22 мг/мл, или 23 мг/мл, или 24 мг/мл, или 25 мг/мл, или 26 мг/мл, или 27 мг/мл, или 28 мг/мл, или 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или, например, 60 мг/мл. Наиболее предпочтительная концентрация составляет от 10 до 20 мг/мл, например 20 мг/мл. Однако оно также может присутствовать в количестве 10 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 15 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 25 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 30 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 35 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 40 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 45 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 50 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 55 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления оно присутствует в количестве 60 мг/мл.

Согласно предпочтительному варианту осуществления буферное средство присутствует в концентрации от 5 до 40 мМ, например 10-30 мМ, предпочтительно 20 мМ. Согласно предпочтительному варианту осуществления буфер представляет собой 20 мМ глутамата при рН 5,1-5,3, таком как 5,2. Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления буфер представляет собой 20 мМ гистидина при рН 5,7-5,9, таком как 5,8.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию. Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция представляет собой водную композицию.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит:

а) 5-50 мг/мл антитела, предпочтительно 5-25 мг/мл антитела, наиболее предпочтительно 10-20 мг/мл антитела,

b) от 10 до 20 мМ глутамата, предпочтительно 15-20 мМ глутамата, наиболее предпочтительно 20 мМ глутамата,

c) от 150 до 350 мМ сорбита, предпочтительно 200-300 мМ сорбита, наиболее предпочтительно 250 мМ сорбита,

d) полисорбат, предпочтительно полисорбат 80, наиболее предпочтительно 0,02% вес/об полисорбата 80,

причем рН данной композиции составляет от 5,0 до 6,0, предпочтительно 5,1-5,3.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция представляет собой:

фармацевтическую композицию, содержащую а) 10-20 мг/мл антитела, б) 20 мМ глутамата, с) 250 мМ сорбита, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,1-5,3.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция представляет собой:

фармацевтическую композицию, содержащую а) 10-20 мг/мл антитела, б) 20 мМ гистидина, с) 250 мМ сорбита, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,7-5,9.

Согласно другому варианту осуществления композиция представляет собой внутривенную композицию и/или данная композиция предназначена для применения при внутривенном введении.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 18, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 19 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 21.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 23, в которой CDR2 представляет собой GTN и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 24.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 26, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 30 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 28.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит переменную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 34, в которой CDR2 представляет собой GAS и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 35.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

переменную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 18, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 19 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 21, и

переменную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 23, в которой CDR2 представляет собой GTN и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 24, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 26, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 30 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 28, и

переменную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 34, в которой CDR2 представляет собой GAS и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 35.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с

человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33, причем области CDR могут быть пронумерованы в соответствии с IMGT.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 33.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и дополнительно содержит константную область тяжелой цепи (CH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 60, и константную область легкой цепи (CL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 64, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 33, и дополнительно содержит константную область тяжелой цепи (CH), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 61, и константную область легкой цепи (CL), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции представляет собой bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или его биоаналог.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства, например для применения в способе лечения заболевания. Согласно предпочтительному варианту осуществления заболевание представляет собой рак. Согласно предпочтительному варианту осуществления рак характеризуется экспрессией B7H4 в раковых клетках. Предпочтительно, указанную экспрессию B7H4 определяют в раковых клетках, полученных от пациента.

Согласно предпочтительному варианту осуществления рак представляет собой солидную опухоль. Предпочтительно, рак выбран из группы, состоящей из рака легких, NSCLC (ADC или SQCC), рака желудка, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака яичников и рака матки.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, причем данный способ предусматривает введение фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанный способ предназначен для лечения рака. Согласно некоторым вариантам осуществления рак выбран из группы, состоящей из карциносаркомы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы эндометрия тела матки (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичников (OV) и холангиокарциномы (CHOL).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в течение времени,

достаточного для лечения данного рака. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят внутривенно.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для внутривенного введения. Согласно предпочтительному варианту осуществления применение предназначено для лечения рака.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к единичной лекарственной форме, содержащей

а) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, в количестве от 5 пг до 120 мг, и

б) буферное средство, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей,

причем рН данной единичной лекарственной формы составляет от 4,0 до 8,0, предпочтительно от 4,5 до 6,5, более предпочтительно от 5,0 до 6,0.

Предпочтительно, количество антитела составляет от 40 пг до 8 г. Согласно некоторым вариантам осуществления количество антитела составляет от 40 пг до 60 мг, например 40 пг, 50 пг, 100 пг, 150, 160 пг, 170 пг, 180 пг, 190 пг, 200 пг, 250 пг, 300 пг, 350 пг, 400 пг, 450 пг, 500 пг, 600 пг, 700 пг, 800 пг, 900 пг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 21 мг, 22 мг, 23 мг, 24 мг, 25 мг, 26 мг, 27 мг, 28 мг, 29 мг, 30 мг, 31 мг, 32 мг, 33 мг, 34 мг, 35 мг, 36 мг, 37 мг, 38 мг, 39 мг, 40 мг, 41 мг, 42 мг, 43 мг, 44 мг, 45 мг, 46 мг, 47 мг, 48 мг, 49 мг, 50 мг, 51 мг, 52 мг, 53 мг, 54 мг, 55 мг, 56 мг, 57 мг, 58 мг, 59 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1500 мг, 2000 мг, 3000 мг, 4000 мг, 5000 мг, 6000 мг или, например, 7000 мг.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления общий объем единичной лекарственной формы составляет от 20 мл до 200 мл, причем данная лекарственная форма предназначена для в/в введения.

Согласно предпочтительному варианту осуществления единичная лекарственная форма содержит неионогенное вспомогательное вещество, предпочтительно сахар или

сахарный спирт. Предпочтительно, неионогенное вспомогательное вещество выбрано из сорбита, сахарозы или их смесей. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество присутствует в концентрации от 100 до 300 мМ, такой как 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ.

Предпочтительно, чтобы единичная лекарственная форма дополнительно содержала d) поверхностно-активное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из моноолеата глицерина, хлорида бензетония, докузата натрия, фосфолипидов, алкиловых эфиров полиэтилена, лаурилсульфата натрия и трикаприлина, хлорида бензалкония, цетримида, хлорида цетилпиридиния и фосфолипидов, альфа-токоферола, моноолеата глицерина, миристилового спирта, фосфолипидов, полоксамеров, алкиловых эфиров полиоксиэтилена, производных полиоксиэтиленового касторового масла, полиоксиэтиленовых эфиров сорбита и жирных кислот, полиоксиэтиленстеаратов, полиоксилгидроксистеарата, полиоксиглицеридов, полисорбатов, дилаурата пропиленгликоля, монолаурата пропиленгликоля, сложных эфиров сорбита, пальмитата сахарозы, стеарата сахарозы, трикаприлина и TPGS и их смесей. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 или 80, наиболее предпочтительно полисорбат 80. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,005% до 0,4% вес/об, например от около 0,01 до 0,1% вес/об, например от около 0,01 до 0,09% вес/об, например от около 0,01 до 0,06% вес/об, например от около 0,01 до 0,05% вес/об, например 0,02% вес/об, или 0,03% вес/об, или 0,04% вес/об, или 0,05% вес/об, предпочтительно 0,02% вес/об.

Согласно предпочтительному варианту осуществления концентрация антитела в единичной лекарственной форме составляет от 0,5 до 100 мг/мл, например от 1,0 до 50 мг/мл или, например, от 5 до 30 мг/мл, например 5 мг/мл, или 6 мг/мл, или 7 мг/мл, или 8 мг/мл, или 9 мг/мл, или 10 мг/мл, или 11 мг/мл, или 12 мг/мл, или 13 мг/мл, или 14 мг/мл, или 15 мг/мл, или 16 мг/мл, или 17 мг/мл, или 18 мг/мл, или 19 мг/мл, или 20 мг/мл, или 21 мг/мл, или 22 мг/мл, или 23 мг/мл, или 24 мг/мл, или 25 мг/мл, или 26 мг/мл, или 27 мг/мл, или 28 мг/мл, или 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или, например, 60 мг/мл.

Согласно предпочтительному варианту осуществления буферное средство присутствует в единичной лекарственной форме в концентрации от 5 до 40 мМ, например 10-30 мМ, предпочтительно 20 мМ.

Согласно предпочтительному варианту осуществления единичная лекарственная форма представляет собой жидкую единичную лекарственную форму.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту единичной лекарственной формы согласно настоящему изобретению в течение времени, достаточного для лечения данного рака. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к единичной лекарственной форме согласно настоящему изобретению для применения в лечении рака.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к контейнеру, содержащему единичную лекарственную форму согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению. Контейнер может быть изготовлен из стекла или из одного или нескольких полимерных материалов.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору компонентов, содержащему:

а. фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, или единичную лекарственную форму согласно любому варианту настоящего изобретения, b. емкость для фармацевтической композиции или для единичной лекарственной формы и с. инструкции по разбавлению и/или по применению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору компонентов, содержащему:

а. фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению или единичную лекарственную форму согласно любому варианту настоящего изобретения, b. разбавитель, с. емкость для единичной лекарственной формы и d. инструкции по разбавлению и/или по применению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору компонентов, такому как набор для применения в качестве сопутствующего диагностикума/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность отвечать на лечение с помощью фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе, содержащий фармацевтическую композицию, как определено в настоящем документе; и инструкции по применению указанного набора.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе,

предусматривающему стадии смешивания в воде для инъекций а. от 0,5 до 120 мг/мл антитела и б. буферного средства и доведения рН до 4,0-8,0, предпочтительно до 5,0-6,0.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения единичной лекарственной формы, как определено в настоящем документе, предусматривающему стадии:

а. получения фармацевтической композиции с помощью стадий вышеописанного способа получения фармацевтической композиции или предоставления фармацевтической композиции, как определено в настоящем документе; б. предоставления разбавителя и с. смешивания фармацевтической композиции и разбавителя до желаемой концентрации антитела.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или единичной лекарственной форме, которые можно получать с помощью любого из вышеописанных способов.

### **Биспецифические форматы**

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям или единичным лекарственным формам, содержащим биспецифические антитела к CD3×V7H4, которые эффективно способствуют опосредованному Т-клетками киллингу экспрессирующих V7H4 опухолевых клеток. В зависимости от желаемых для конкретного применения функциональных свойств конкретные антигенсвязывающие области могут быть выбраны из множества антител или антигенсвязывающих областей, предлагаемых настоящим изобретением. Множество различных форматов и применений биспецифических антител известно в данной области техники и рассмотрено Kontermann; *Drug Discov Today*, 2015 Jul; 20(7):838-47; *MAbs*, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97. Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением не может быть ограничено каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения.

Примерами молекул биспецифических антител, которые можно использовать в настоящем изобретении, служат (i) одно антитело, имеющее два плеча, содержащие различные антигенсвязывающие области; (ii) одноцепочечное антитело, которое обладает специфичностью к двум различным эпитопам, например, благодаря двум scFv, связанным в тандеме дополнительным пептидным линкером; (iii) антитело с двойным варибельным доменом (DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержат по два варибельных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, в *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) химически связанный биспецифический

(Fab')<sub>2</sub>-фрагмент; (v) TandAb, которое представляет собой слияние двух одноцепочечных диател, что приводит к тетравалентному биспецифическому антителу, которое содержит по два сайта связывания для каждого из антигенов-мишеней; (vi) FlexiBody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом, что приводит к мультивалентной молекуле; (vii) так называемая молекула «Dock-and-Lock» на основе «домена димеризации и докинга» протеинкиназы А, который при применении к Fab может давать трехвалентный биспецифический связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, связанных с иным Fab-фрагментом; (viii) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, слитые с обоими концами человеческого Fab-плеча; и (ix) диатело.

Согласно одному варианту осуществления биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляет собой диатело, перекрестное антитело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами, также известное как DuoBody® (такое, как описано в документе WO2011131746 (Genmab)).

Примерами различных классов биспецифических антител служат, но без ограничения, (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 для принудительной гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух различных антител; (iii) слитые молекулы IgG, где полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) слитые молекулы Fc, где одноцепочечные Fv-молекулы или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; (v) слитые молекулы Fab, где различные Fab-фрагменты слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диател и с тяжелыми цепями (например, доменные антитела, нанотела), где различные одноцепочечные Fv-молекулы, или различные диатела, или различные антитела с тяжелыми цепями (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем, слитыми с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями.

Примерами IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами домена CH3 служат, но без ограничения, молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO2011069104), так называемые молекулы «Knobs-into-Holes» (Genentech, WO9850431), CrossMAb (Roche, WO2011117329) и электростатически совпадающие молекулы (Amgen, EP1870459 и WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), молекулы LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52):

43331-9, doi: 10,1074/jbc.M112,397869. Epub 2012 Nov 1), молекулы DIG-body и PIG-body (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), молекулы тел с доменами, сконструированными путем обмена частями (Strand Exchange Engineered Domain body, SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), молекулы Biclomics (Merus, WO2013157953), молекулы Fc $\Delta$ Adp (Regeneron, WO201015792), биспецифические молекулы IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), молекулы с остовом Azymetric (Zymeworks/Merck, WO2012058768), молекулы mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), бивалентные биспецифические антитела (WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab A/S, WO2011131746).

Примерами рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием служат, но без ограничения, молекул с двойным нацеливанием (Dual Targeting) (DT)-Ig (WO2009058383), антитела «два в одном» (Genentech; Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614.), сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), молекулы Zybody (Zyngenia; LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), подходы с обычной легкой цепью (Crucell/Merus, US7262028), κλBody (NovImmune, WO2012023053) и CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17501–506).

Примерами слитых молекул IgG служат, но без ограничения, молекулы Ig с двойным переменным доменом (DVD)-Ig (Abbott, US7612181), двухдоменные «двухголовые» антитела (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), IgG-подобные биспецифические молекулы (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ; Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) и молекулы BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), молекулы HERCULES (Biogen Idec, US007951918), молекулы слияния scFv (Novartis), молекулы слияния scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и молекулы TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Примерами слитых молекул Fc служат, но без ограничения, слияния ScFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179-88), молекулы SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100 th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), молекулы Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538) и молекулы Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine – Китай).

Примерами слитых биспецифических антител Fab служат, но без ограничения, F(ab)2-молекулы (Medarex/AMGEN; Deo et al J Immunol. 1998 Feb 15;160(4):1677-86.), молекулы Dual-Action или Bis-Fab (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614.), молекулы Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809),

бивалентные биспецифические молекулы (Biotecol, Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7050-7.) и молекулы Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

Примерами антител на основе ScFv, диател и доменных антител служат, но без ограничения, молекулы биспецифического активатора Т-клеток (BiTE) (Micromet, WO2005061547), молекулы тандемных диател (TandAb) (Affimed) Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):357-66.), молекулы Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538), молекулы одноцепочечных диател (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние человеческого сывороточного альбумина с ScFv (Merrimack, WO2010059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75.), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010) и доменные антитела только с тяжелой цепью с двойным нацеливанием.

Биспецифическое антитело, используемое в композициях согласно настоящему изобретению, может относиться к любому изотипу. Примерами изотипов служат, но без ограничения, любой из человеческих изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительно, могут быть выбраны биспецифические антитела человеческого изотипа IgG1, как показано в примерах. Можно использовать любую из человеческих константных областей легкой цепи, каппа или лямбда. Согласно одному варианту осуществления обе тяжелые цепи антитела согласно настоящему изобретению относятся к изотипу IgG1. Согласно одному варианту осуществления две тяжелые цепи биспецифического антитела относятся к изотипам IgG1 и IgG4, соответственно. Предпочтительно, могут быть выбраны биспецифические антитела человеческого изотипа IgG1, как показано в примерах. Необязательно и предпочтительно, тяжелая цепь и ее последовательности Fc выбранного изотипа могут быть модифицированы в шарнирной и/или СН3-области, как описано в настоящем документе, чтобы сделать возможным образование биспецифических антител и обеспечить инертность.

Согласно одному аспекту биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению содержит Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь с первой последовательностью Fc, содержащую первую область СН3, и вторую тяжелую цепь со второй последовательностью Fc, содержащую вторую область СН3, причем последовательности первой и второй областей СН3 различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй СН3 областями сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СН3. Более подробно эти взаимодействия и то, как их можно достичь, описано в документах

WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Как описано далее в настоящем документе, стабильное биспецифическое антитело к CD3×B7H4 может быть получено с высоким выходом на основе одного антитела к B7H4 и одного антитела к CD3, каждое из которых состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, причем каждое антитело содержит только несколько достаточно консервативных (асимметричных) мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат одну или несколько аминокислотных замен в неидентичных положениях.

### **Антигенсвязывающая область, способная связывать CD3**

Как уже было сказано, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная связывать CD3, способна связывать CD3ε (эпсилон) человека, такую как CD3ε (эпсилон) человека, как определено в SEQ ID NO: 13. Такая антигенсвязывающая область способна связывать CD3ε (эпсилон) человека, представленную на Т-клетке, такой как первичная человеческая Т-клетка.

Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 16 или согласно SEQ ID NO: 17, и, необязательно,

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22.

Области CDR1, CDR2 и CDR3 можно идентифицировать из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей с использованием способов, известных в данной области техники. Области CDR из указанных вариабельных областей тяжелой и легкой цепей могут быть аннотированы в соответствии с IMGT (смотри документы Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999, и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)).

Следовательно, также раскрыты антитела, содержащие антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 18, 19 и 20 или 18, 19 и 21; и, необязательно,

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24.

Также раскрыты антитела, содержащие антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 16; и, необязательно,

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22.

Такие антигенсвязывающие области, которые способны связывать человеческий CD3, описаны, в частности, в документах WO2015001085 и WO2017009442. Другие антигенсвязывающие области, которые способны связывать человеческий CD3, раскрыты и описаны в документах WO2015001085 и WO2017009442, которые могут быть дополнительно рассмотрены и могут служить основой для создания антител в соответствии с настоящим изобретением и которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с равновесной константой диссоциации  $K_D$  между антигенсвязывающей областью, которая связывается с человеческим CD3, и человеческим CD3 в диапазоне 1–1000 нМ.

Указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с равновесной константой диссоциации  $K_D$  между антигенсвязывающей областью, которая

связывается с человеческим CD3, и человеческим CD3 в диапазоне 1–100 нМ, например в диапазоне 5–100 нМ, в диапазоне 10–100 нМ, в диапазоне 1–80 нМ, в диапазоне 1–60 нМ в диапазоне 1–40 нМ, в диапазоне 1–20 нМ, в диапазоне 5–80 нМ, в диапазоне 5–60 нМ, в диапазоне 5–40 нМ, в диапазоне 5–20 нМ, в диапазоне 10–80 нМ, в диапазоне 10–60 нМ, в диапазоне 10–40 нМ или, например, в диапазоне 10–20 нМ. Типичная и подходящая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 16 и переменную область легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 22. Такие переменные области описаны, в частности, в документе WO2015001085.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения указанное антитело характеризуется более низкой аффинностью связывания с CD3ε человека, чем антитело, содержащее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, как изложено в SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, как изложено в SEQ ID NO: 22, причем, предпочтительно, указанная аффинность по меньшей мере в 5 раз ниже, например, по меньшей мере в 10 раз ниже, например по меньшей мере в 20 раз ниже, по меньшей мере в 30 раз ниже, по меньшей мере в 40 раз ниже, по меньшей мере в 45 раз ниже или, например, по меньшей мере в 50 раз ниже.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения указанное антитело может связываться с равновесной константой диссоциации  $K_D$  между антигенсвязывающей областью, которая связывается с человеческим CD3, и человеческим CD3, которая находится в диапазоне 200–1000 нМ, например в диапазоне 300–1000 нМ, в диапазоне 400–1000 нМ, в диапазоне 500–1000 нМ, в диапазоне 300–900 нМ в диапазоне 400–900 нМ, в диапазоне 400–700 нМ, в диапазоне 500–900 нМ, в диапазоне 500–800 нМ, в диапазоне 500–700 нМ, в диапазоне 600–1000 нМ, в диапазоне 600–900 нМ, в диапазоне 600–800 нМ или, например, в диапазоне 600–700 нМ. Типичная и подходящая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 16 или согласно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 22. Такие переменные области описаны, в частности, в документе WO2017009442.

Указанная аффинность связывания может быть определена с помощью биослойной интерферометрии, необязательно как изложено в примере 4 в настоящем документе. Следовательно, антитело в соответствии с настоящим изобретением, характеризующееся аффинностью связывания с человеческим CD3, как определено в настоящем документе, можно характеризовать аффинностью связывания, определенной с использованием биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре захвата Fc IgG человека;

II) определения ассоциации в течение периода времени, составляющего 1000 секунд, и диссоциации в течение периода времени, составляющего 2000 секунд, человеческой рекомбинантной растворимой CD3ε (CD3E27-GSKa) (зрелый белок согласно SEQ ID NO: 13) с использованием серии 3-кратных разведений в диапазоне от 1,40 нМ до 1000 нМ.

III) сопоставления данных с контрольным буфером (0 нМ).

Кроме того, указанная аффинность связывания может быть определена с использованием антитела, такого как моноспецифическое бивалентное антитело, такое как антитело, который представляет собой полноразмерный IgG1.

Следовательно, согласно другому варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором

антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), как определено в настоящем документе, содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3, которая по сравнению с переменной областью тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, содержит аминокислотную замену, находящуюся в положении, выбранном из группы, состоящей из T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, причем положения пронумерованы в соответствии с последовательностью согласно SEQ ID NO: 16; и

переменная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 23, GTN и SEQ ID NO: 24, соответственно.

В частности, антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит в переменной области тяжелой цепи (VH), как определено в настоящем документе, замену, выбранную из группы, состоящей из T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

Кроме того, антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи, как определено в настоящем документе, содержащую M или P в аминокислотном положении 31, или E в аминокислотном положении 57, или G или N в аминокислотном положении 101, или P в аминокислотном положении 105, или A или G в аминокислотном положении 110, или M, R или V в аминокислотном положении 114, причем указанные положения соответствуют нумерации аминокислотных положений переменной области тяжелой цепи (VH), имеющей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

Кроме того, антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, как определено в настоящем документе, содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей согласно SEQ ID NO: 16, причем указанные аминокислотные замены включают, предпочтительно, аминокислотные замены, как определено выше.

Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антитела, содержащие антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17; и, необязательно,

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22.

#### **Антигенсвязывающая область, способная связывать B7H4**

В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям или единичным лекарственным формам, содержащим антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанный человеческий B7H4 представляет собой человеческий B7H4 согласно SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3ε (эпсилон) человека, как определено в SEQ ID NO: 13, и антигенсвязывающую область, способную связывать B7H4 человека согласно SEQ ID NO: 1.

В частности, антитело, используемое в композициях согласно настоящему изобретению, представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, способна связываться с

внеклеточным доменом человеческого В7Н4. Предпочтительно, указанный В7Н4 экспрессируется в клетке, более предпочтительно, в человеческой клетке.

Согласно другому варианту осуществления антитело, используемое в композициях согласно настоящему изобретению, представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, способна связываться с IgC-подобной константной областью человеческого В7Н4. Согласно еще одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, способна связываться с В7Н3-IgV/В7Н4-IgC. В7Н3-IgV/В7Н4-IgC представляет собой слияние человеческих В7Н3 и В7Н4, причем IgV-подобный домен В7Н3 слит с IgC-подобным доменом В7Н4, соответствующим SEQ ID NO: 11. Указанный В7Н3-IgV/В7Н4-IgC экспрессируется клеткой, такой как описанные в примере 7 в настоящем документе. Согласно еще одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, не способна связываться с В7Н4-IgV/В7Н3-IgC. В7Н4-IgV/В7Н3-IgC представляет собой слияние человеческих В7Н3 и В7Н4, причем IgV-подобный домен В7Н4 слит с IgC-подобным доменом В7Н3, соответствующим SEQ ID NO: 10. Указанный В7Н4-IgV/В7Н3-IgC экспрессируется клеткой, такой как описанные в примере 7 в настоящем документе.

Подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим В7Н4, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

б) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

в) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 40;

г) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 47;

е) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 54; или

ф) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

г) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 69.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим B7H4, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33.

Области CDR1, CDR2 и CDR3 можно идентифицировать из переменных областей тяжелой и легкой цепей с использованием способов, известных в данной области техники. Области CDR из указанных переменных областей тяжелой и легкой цепей могут быть аннотированы в соответствии с IMGT (смотри документы Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999, и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)). Следовательно, подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим B7H4, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

б) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

в) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 37, 38 и 39, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 41, DTS и SEQ ID NO: 42;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 44, 45 и 46, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 48, YTS и SEQ ID NO: 49;

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 51, 52 и 53, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 55, GAS и SEQ ID NO: 56; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 70, GAS и SEQ ID NO: 71.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим B7H4, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35.

Дополнительные подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим B7H4, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

a) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

c) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 31 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим B7H4, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

Необязательно, указанные антигенсвязывающие области, которые связываются с B7H4, содержат переменные области тяжелой и легкой цепей (VH), характеризующиеся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с:

a) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

b) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

c) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

d) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

e) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

f) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 31; и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

g) переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

Согласно предпочтительному варианту осуществления указанные антигенсвязывающие области, которые связываются с B7H4, содержат переменные области тяжелой и легкой цепей (VH), характеризующиеся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с переменной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением может содержать антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, характеризующуюся

аффинностью связывания с человеческим В7Н4, которая соответствует значению  $K_D$   $5E-7$  М или меньше, например  $1E-7$  М или меньше, например аффинностью связывания, соответствующей значению  $K_D$ , которое находится в диапазоне от  $5E-7$  до  $2E-10$  М, например в диапазоне от  $2E-7$  до  $1E-10$  М или от  $1E-7$  до  $5E-9$  М.

Указанная аффинность связывания может быть определена с помощью биослойной интерферометрии, необязательно как изложено в примере 3 в настоящем документе. Следовательно, антитело в соответствии с настоящим изобретением, характеризующееся аффинностью связывания с человеческим В7Н4, как определено в настоящем документе, можно характеризовать аффинностью связывания, определенной с использованием биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре захвата Fc IgG человека;

II) определения ассоциации в течение периода времени, составляющего 300 секунд, и диссоциации в течение периода времени, составляющего 1000 секунд, человеческого рекомбинантного меченного His белка В7Н4 (Sino Biological, каталожный номер 10738-Н08Н; белок, экспрессируемый из конструкции последовательности ДНК, кодирующей человеческий VTCN1 (номер доступа в Uniprot Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой) с использованием серии 2-кратных разведений в диапазоне от 1,56 нМ до 100 нМ.

III) сопоставления данных с контрольным буфером (0 нМ).

Кроме того, указанная аффинность связывания может быть определена с использованием антитела, такого как моноспецифическое бивалентное антитело, такое как антитело, который представляет собой полноразмерный IgG1.

Согласно другому варианту осуществления предлагается антитело в соответствии с настоящим изобретением, содержащее антигенную область, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию:

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33; и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40; и

причем указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

Согласно еще одному варианту осуществления указанное антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит антигенную область, способную связываться с человеческим B7H4, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69;

и причем указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию антитела, содержащего

антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33; и

антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40.

В частности, «перекрестное блокирование», или способность антитела в соответствии с настоящим изобретением блокировать связывание другого антитела с B7H4, определяют как способность первого антитела, связанного с B7H4, блокировать связывание второго антитела с B7H4, связанного с первым антителом. Перекрестное блокирование можно определять с помощью анализа, описанного в примере 5. Такое перекрестное блокирование также можно определять, например, с помощью процедуры, предусматривающей стадии:

i) предоставления набора образцов, причем каждый образец содержит антитело, которое связывается с B7H4;

ii) иммобилизации первого антитела из набора образцов в количестве 20 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре Amine Reactive 2-го поколения (AR2G);

iii) загрузки на биосенсор ARG2 иммобилизованного антитела с человеческим B7H4 (100 нМ человеческого рекомбинантного меченого His белка B7H4 (Sino Biological, каталожный номер 10738-H08H; белок, экспрессируемый из конструкции

последовательности ДНК, кодирующей человеческий VTCN1 (номер доступа в Uniprot Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой);

iv) определения ассоциации второго антитела из набора образцов в количестве 10 мкг/мл в течение 300 секунд.

Если второе антитело не способно к ассоциации, считается, что первое антитело перекрестно блокирует второе антитело. Специалист в данной области техники будет знаком с подходящими технологиями определения способности антитела перекрестно блокировать связывание другого антитела с его мишенью, настоящая заявка раскрывает процедуры, подходящие для определения блокирования связывания и вытеснения. Согласно другому варианту осуществления перекрестное блокирование, как описано в настоящем документе, определяют, как описано в примере 5.

Согласно другому варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, соответствует признаку перекрестного блокирования, как описано выше, причем указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, способна связываться с В7Н3-IgV/В7Н4-IgC (SEQ ID NO: 11) и, необязательно, не способна связываться с В7Н4-IgV/В7Н3-IgC (SEQ ID NO: 10).

#### **Комбинации антигенсвязывающих областей CD3 и В7Н4**

Настоящее раскрытие дополнительно относится к фармацевтическим композициям или единичным лекарственным формам, содержащим антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

с) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 69.

К тому же, области CDR1, CDR2 и CDR3 могут быть идентифицированы из переменных областей тяжелой и легкой цепей с использованием способов, известных в данной области техники. Области CDR из указанных переменных областей тяжелой и легкой цепей могут быть аннотированы в соответствии с IMGT (смотри документы Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999, и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)). Согласно предпочтительным вариантам осуществления области CDR из переменных областей тяжелой и легкой цепей согласно настоящему изобретению аннотированы в соответствии с IMGT.

Настоящее раскрытие дополнительно относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 69.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33.

Кроме того, настоящее раскрытие дополнительно относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и

антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 18, 19 и 20; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

b) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

c) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 37, 38 и 39, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 41, DTS и SEQ ID NO: 42;

d) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 44, 45 и 46, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 48, YTS и SEQ ID NO: 49;

e) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 51, 52 и 53, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 55, GAS и SEQ ID NO: 56; или

f) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

g) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 70, GAS и SEQ ID NO: 71.

Настоящее раскрытие дополнительно относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 18, 19 и 21; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

с) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 37, 38 и 39, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 41, DTS и SEQ ID NO: 42;

д) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 44, 45 и 46, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 48, YTS и SEQ ID NO: 49;

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 51, 52 и 53, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 55, GAS и SEQ ID NO: 56; или

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

g) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 70, GAS и SEQ ID NO: 71.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 18, 19 и 21; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35.

Также раскрыты фармацевтические композиции и единичные лекарственные формы антител, содержащих антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит антигенсвязывающие области, которые связываются с В7Н4, содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей (VH), содержащие:

a) вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

b) вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

с) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 31 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

Кроме того, раскрыты фармацевтические композиции и единичные лекарственные формы антител, содержащих антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит антигенсвязывающие переменные области тяжелой и легкой цепей (VH), содержащие:

a) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

с) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 31 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22; и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

Согласно другому варианту осуществления в таком биспецифическом антителе указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа; и указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в таком биспецифическом антителе к CD3×В7Н4 одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO: 60, и другая является такой, как определено в SEQ ID NO: 61, причем указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO: 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO: 64. Следует понимать, что, необязательно, из указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, могут быть удалены.

Согласно, соответственно, предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к CD3×В7Н4 фармацевтической композиции единичной лекарственной формы содержит область связывания CD3, содержащую:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и, кроме того, константную область тяжелой

цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60, и константную область легкой цепи лямбда, как определено в SEQ ID NO: 64,

и область связывания В7Н4, содержащую:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 33, и, кроме того, константную область тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 61, и константную область легкой цепи каппа, как определено в SEQ ID NO: 63, причем, необязательно, у указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, могут быть удалены концевые лизины.

Как хорошо известно специалисту в данной области техники, каждая антигенсвязывающая область антитела обычно содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), и каждая из вариабельных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и может содержать четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Каждая антигенсвязывающая область антитела может обычно содержать вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), и каждая из вариабельных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и может содержать четыре человеческие каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Эта структура, предпочтительно, также присутствует в антителах в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL). Примеры константных областей приведены, в частности, в SEQ ID NO: 57-64.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело, используемое в фармацевтических композициях и единичных лекарственных формах согласно изобретению, содержит первую и вторую тяжелые цепи, такие как первая и вторая тяжелые цепи, причем каждая из них содержит по меньшей мере шарнирную область, область СН2 и СН3. Стабильные гетеродимерные антитела могут быть получены с высоким выходом, например, путем так называемого обмена Fab-плеч, как предложено в документах WO 2008/119353 и WO 2011/131746, на основе двух гомодимерных исходных белков, содержащих лишь несколько асимметричных мутаций в областях СН3. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело содержит первую тяжелую цепь, причем по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из Т366, L368, K370,

D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, была заменена, и вторую тяжелую цепь, причем по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, была заменена, причем указанные замены в указанной первой и указанной второй тяжелых цепях сделаны не в одних и тех же положениях, и причем положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией Eu. Например, константные домены, содержащие такую замену, представлены, в частности, в SEQ ID NO: 58 и 62, которые можно сравнить с SEQ ID NO: 57, которая не содержит такой замены.

Термин «аминокислота, соответствующая положениям» при использовании в настоящем документе относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи человеческого IgG1. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем выравнивания с человеческим IgG1. Если иное не указано или не противоречит контексту, аминокислоты последовательностей константной области пронумерованы в настоящем документе в соответствии с EU-индексом нумерации (описанным в документе Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, стр. 662, 680, 689). Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которые «соответствуют» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, представляет собой аминокислоту или сегмент, которые выравниваются с другими аминокислотой или сегментом при использовании единичной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно с настройками по умолчанию, и характеризуются идентичностью по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% с тяжелой цепью человеческого IgG1. В данной области техники считается хорошо известным, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определять положение в последовательности, соответствующее положению аминокислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, причем аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит, в дополнение к антигенсвязывающим областям, Fc-область с последовательностями Fc двух тяжелых цепей. Каждая из первой и второй последовательностей Fc может относиться к любому изотипу, включая любой человеческий изотип, такой как изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM или IgA или смешанный изотип. Предпочтительно, Fc-область относится к человеческому изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу, такому как человеческий изотип IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно, чтобы антитело в соответствии с настоящим изобретением представляло собой полноразмерное антитело, наиболее предпочтительно, оно относится к типу IgG1.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать модификации в Fc-области, делающие антитело инертным или неактивирующим антителом. Следовательно, в антителах, раскрытых в настоящем документе, одна или обе тяжелые цепи могут быть модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением того, что оно содержит немодифицированные первую и вторую тяжелые цепи. Fc-опосредованную эффекторную функцию можно измерять с помощью определения Fc-опосредованной экспрессии CD69 на Т-клетках (то есть экспрессии CD69 в результате опосредованного антителом к CD3 Fc $\gamma$ -рецептор-зависимого сшивания CD3), с помощью связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами, с помощью связывания с C1q или с помощью индукции Fc-опосредованного сшивания Fc $\gamma$ R. В частности, константные последовательности тяжелой цепи могут быть модифицированы таким образом, чтобы Fc-опосредованная экспрессия CD69 снижалась по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с антителом дикого типа (немодифицированным), причем указанную Fc-опосредованную экспрессию CD69 определяют с помощью функционального анализа на основе РВМС, например как описано в примере 3 документа WO2015001085. Модификации константных последовательностей тяжелой и легкой цепей также могут приводить к снижению связывания C1q с указанным антителом. По сравнению с немодифицированным антителом снижение может составлять по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100%, и связывание C1q можно определять с помощью ELISA. Кроме того, Fc-область, которая может быть модифицирована таким образом, чтобы указанное антитело опосредовало снижение Fc-опосредованной пролиферации Т-клеток по сравнению с немодифицированным антителом по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по

меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 99% или на 100%, причем указанную пролиферацию Т-клеток измеряют с помощью функционального анализа на основе РВМС.

Был разработан широкий спектр различных форматов неактивирующих антител, в которых аминокислотные замены и их комбинации были введены в константную область тяжелой цепи антитела изотипа IgG1 для устранения Fc-опосредованных эффекторных функций (например, Chiu et al., *Antibodies*, 2019 Dec; 8(4): 55; Liu et al., *Antibodies*, 2020 Nov 17;9(4):64; 29(10):457-66; Shields et al., *J Biol Chem*, 2001 Mar 2;276(9):6591-604).

Примерами положений аминокислот, которые могут быть модифицированы, например, в антителе изотипа IgG1, служат положения L234 и L235. Следовательно, антитело в соответствии с настоящим изобретением может содержать первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляют собой, соответственно, F и E. Следует понимать, что в дополнение к модификациям положений аминокислот L234 и L235 могут быть модифицированы и другие положения.

Кроме того, аминокислотная замена D265A может уменьшать связывание с всеми Fcγ-рецепторами и предотвращать ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276):6591-604). Поэтому антитело в соответствии с настоящим изобретением может содержать первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляет собой A. Другие варианты осуществления настоящего изобретения предлагают антитела, в которых в по меньшей мере одной, например в обеих, из указанных первой и второй тяжелых цепей аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235, и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой, соответственно, F, Eи A. Согласно настоящей заявке антитела, которые содержат комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A и, кроме того, мутацию K409R или F405L, раскрытую в настоящем документе выше, могут быть обозначены с суффиксом «FEAR» или «FEAL», соответственно.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 дикого типа идентифицирована в настоящем документе как SEQ ID NO: 57. В соответствии с вариантами осуществления, раскрытыми выше, антитело согласно настоящему изобретению может содержать константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену F405L, и может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

58, и/или константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену K409R, и может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E и D265A, идентифицирована в настоящем документе как SEQ ID NO: 59. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и F405L, идентифицирована в настоящем документе как SEQ ID NO: 60. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и K409R, идентифицирована в настоящем документе как SEQ ID NO: 61.

В последовательностях константной области, перечисленных в SEQ ID NO: 57-62, указан концевой лизин (K), такие последовательности были использованы в разделе примеров в настоящем документе. Этот лизин происходит из встречающейся в природе последовательности, обнаруженной у людей, из которой получены эти Fc-области. Во время продукции рекомбинантных антител в клеточной культуре этот концевой лизин может быть отщеплен путем протеолиза эндогенной карбоксипептидазой(ами), в результате чего образуется константная область с той же последовательностью, но без C-концевого лизина. Для целей производства антител ДНК, кодирующая этот концевой лизин, может быть исключена из последовательности, так что антитела продуцируются без лизина. Антитела, полученные из последовательностей нуклеиновой кислоты, которые либо кодируют, либо не кодируют концевой лизин, по существу идентичны по последовательности и функции, поскольку степень процессинга концевого лизина обычно высока, например, при использовании антител, продуцируемых в системах продукции на основе CHO (Dick, L.W. et al. *Biotechnol. Bioeng.* 2008;100: 1132–1143). Следовательно, следует понимать, что антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены без кодирования или наличия концевого лизина, как приведено в настоящем документе. Таким образом, для производственных целей антитела могут быть получены без концевого лизина.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, в которых

а) антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, является человеческой, и

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и единичным лекарственным формам антитела, в которых

а) антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, является человеческой, и/или

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь каппа ( $\kappa$ ). Последовательность согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, касающимся биспецифических антител, легкая цепь каппа содержит последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела к В7Н4, как раскрыто выше.

Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь лямбда ( $\lambda$ ). Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, касающимся биспецифических антител, легкая цепь лямбда содержит последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела к CD3, как раскрыто выше, в частности последовательности CDR1, -2 и -3 антитела к CD3, характеризующегося пониженной аффинностью к CD3, как раскрыто выше. Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 63, и аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 64.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело содержит легкую цепь лямбда ( $\lambda$ ) и легкую цепь каппа ( $\kappa$ ); например антитело с тяжелой цепью и легкой цепью лямбда, которые содержат область связывания, способную связываться с CD3, и с тяжелой цепью и легкой цепью каппа, которые содержат область связывания, способную связываться с В7Н4.

Следовательно, согласно другому варианту осуществления в биспецифическом антителе, как определено в настоящем документе, указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1 и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа; и указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в указанном биспецифическом антителе одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO: 60, и другая является такой, как определено в SEQ ID NO: 61, и указанная константная область

легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO: 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO: 64. Следует понимать, что у указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, могут быть удалены их концевые лизины.

#### **Связывание, цитотоксичность и активация Т-клеток**

Антитела, такие как биспецифические антитела, как описано в настоящем документе, которые могут связываться с человеческим CD3 и человеческим B7H4, могут обеспечивать преимущество, состоящее в нацеливании Т-клеток на экспрессирующие человеческий B7H4 раковые клетки, тем самым индуцируя опосредованный Т-клетками киллинг указанных раковых клеток. Благодаря сниженной или инертной Fc-функциональности таких антител, как показано в разделе примеров, безопасное, эффективное и достаточное антитело может быть введено пациентам-людям, будучи при этом эффективными против широкого диапазона видов рака, различающихся по уровням экспрессии B7H4.

Как уже было сказано, предпочтительно, антитело в соответствии с настоящим изобретением лишено Fc-опосредованной эффекторной функции, или эта функция снижена, и, кроме того, данное антитело:

а) способно связываться с экспрессирующими B7H4 человеческими опухолевыми клетками, как описано в примере 9 и 10 в настоящем документе,

б) способно опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность в отношении экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток при использовании, например, очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе,

с) способно опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность в одной или нескольких линиях человеческих экспрессирующих B7H4 опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, при использовании, например, очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе,

д) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток; например при анализе, как описано в примере 13 в настоящем документе,

е) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии одной или нескольких линий экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650; например при анализе, как описано в примере 13 в настоящем документе,

f) способно индуцировать цитотоксичность в отношении экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток; например при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе, и/или

g) способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность в одной или нескольких линиях экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650; например при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе.

Кроме того, антитело в соответствии с настоящим изобретением может быть лишено Fc-опосредованной эффекторной функции, или эта функция может быть снижена, и, кроме того способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность, причем цитотоксичность оценивают с помощью анализа IC50 *in vitro*, предусматривающего:

i) предоставление выделенных мононуклеарных клеток периферической крови (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) или очищенных Т-клеток из светлых слоев здорового донора-человека,

ii) предоставление экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, таких как линия человеческих экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, выбранная из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650;

iii) объединение указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток с несколькими образцами указанных экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, причем соотношение количества Т-клеток из указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток и выбранных опухолевых клеток составляет 8:1;

iv) предоставление указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в диапазоне, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной человеческой экспрессирующей В7Н4 опухолевой клетки, и

v) инкубирование образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C; и, затем,

vi) оценку жизнеспособности экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток,

vii) определение процентной доли жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и

viii) определение IC50.

Вместо выделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), на стадии i) можно также предоставлять очищенные Т-клетки.

Соответственно, антитело может характеризоваться IC50 в диапазоне 0,001–2 микрограмм/мл, причем IC50 определяют с помощью анализа цитотоксичности *in vitro*, предусматривающего стадии:

- i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) из светлых слоев здорового донора-человека,
- ii) предоставления экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, таких как линия человеческих экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, выбранная из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3 и HCC1954;
- iii) объединения указанных PBMC с несколькими образцами указанных экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, причем соотношение количества Т-клеток из указанных PBMC и выбранных опухолевых клеток составляет 8:1;
- iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в диапазоне, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной человеческой экспрессирующей В7Н4 опухолевой клетки, и
- v) инкубирования образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C; и, затем,
- vi) оценки жизнеспособности экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток,
- vii) определения процентной доли жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и
- viii) определения IC50.

Соответственно, антитело может характеризоваться IC50 в диапазоне 0,001–5 микрограмм/мл, причем IC50 определяют с помощью анализа цитотоксичности *in vitro*, предусматривающего стадии:

- i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) или очищенных Т-клеток из светлых слоев здорового донора-человека,
- ii) предоставления экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, таких как линия человеческих экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, выбранная из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650;
- iii) объединения указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток с несколькими образцами указанных экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, причем соотношение количества Т-клеток из указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток и выбранных опухолевых клеток составляет 8:1;
- iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в диапазоне, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной человеческой экспрессирующей В7Н4 опухолевой клетки, и

v) инкубирования образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C; и, затем,

vi) оценки жизнеспособности экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток,

vii) определения процентной доли жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и

viii) определения IC50.

Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может характеризоваться IC50 в диапазоне 0,001–5 микрограмм/мл. Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может характеризоваться IC50 в диапазоне 0,001–2 микрограмм/мл. Согласно другому варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может характеризоваться IC50 в диапазоне 0,001–0,03 микрограмм/мл. Согласно еще одному варианту осуществления IC50 может находиться в диапазоне 0,05–2 микрограмм/мл. Согласно еще одному варианту осуществления IC50 может находиться в диапазоне 0,05–5 микрограмм/мл. Указанное значение IC50 может быть определено с использованием способа, такого как описанный в примере 12.

Согласно другому варианту осуществления способность антитела в соответствии с настоящим изобретением опосредовать активацию Т-клеток определяют с помощью анализа *in vitro*, предусматривающего стадии:

i) предоставления выделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из светлых слоев здорового донора-человека,

ii) предоставления экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток;

iii) объединения PBMC и экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток в несколько образцов, причем соотношение количества PBMC и опухолевых клеток составляет 8:1;

iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в диапазоне, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл и

v) инкубирования образцов, например, в течение 72 часов при 37°C; и

vi) последующего обнаружения цитокинов.

Примером цитокинов, которые можно, например, обнаруживать, является, например, IFN- $\gamma$ , как, например, описано в примере 13. Предпочтительно, экспрессирующие В7Н4 опухолевые клетки представляет собой человеческие экспрессирующий В7Н4 опухоли, такие как первичные опухоли, или линии опухолевых клеток, выбранные из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3 и HCC1954.

#### **Антитела к В7Н4**

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или единичной лекарственной форме, содержащей

антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

б) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

в) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

г) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

д) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

е) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

ж) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33; или

з) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

и) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 31 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

й) переменные области тяжелой (VH) и легкой (VH) цепей, характеризующиеся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с соответствующими

вариабельной областью тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и вариабельной областью легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33,

причем данная фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма дополнительно содержит буферное средство, и причем рН данной композиции составляет от 4,0 до 8,0.

Такие антитела не обязательно содержат антигенсвязывающую область, которая связывается с CD3. Такие антитела могут быть полезны, например, в наборах и анализах для обнаружения В7Н4. Такие антитела также могут быть полезны при лечении рака. Следовательно, такое антитело может представлять собой моноспецифическое антитело, связывающееся с В7Н4. Такое антитело может представлять собой бивалентное антитело.

Предпочтительно, чтобы рН фармацевтической композиции или единичной лекарственной формы составлял от 4,5 до 6,5. Согласно предпочтительному варианту осуществления, рН фармацевтической композиции или единичной лекарственной формы составляет от 5,0 до 6,5. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления рН фармацевтической композиции или единичной лекарственной формы составляет от 5,0 до 6,0. Согласно предпочтительному варианту осуществления буферное средство выбрано из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей. Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит с) неионогенное вспомогательное вещество. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество представляет собой сахар или сахарный спирт. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество выбрано из сорбита, сахарозы или их смесей. Согласно предпочтительному варианту осуществления неионогенное вспомогательное вещество присутствует в концентрации от 100 до 300 мМ, такой как 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ. Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит d) поверхностно-активное вещество. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 или 80, наиболее предпочтительно полисорбат 80. Согласно предпочтительному варианту осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,005% до 0,4% вес/об, например от около 0,01 до 0,1% вес/об, например от около 0,01 до 0,09% вес/об, например от около 0,01 до 0,06% вес/об, например от около 0,01 до 0,05% вес/об, например 0,02% вес/об, или 0,03% вес/об, или 0,04% вес/об, или 0,05% вес/об, предпочтительно 0,02% вес/об. Любые признаки или варианты осуществления, описанные выше для первого

аспекта настоящего изобретения, также могут применяться к этому аспекту настоящего изобретения.

Предпочтительно, такое антитело представляет собой антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область человеческого IgG1. Например, константную область тяжелой цепи, такую как приведенные в SEQ ID NO: 57-62. Предпочтительной константной областью легкой цепи является легкая цепь каппа, такая как приведенная в SEQ ID NO: 63.

Согласно одному варианту осуществления антитело фармацевтической композиции или единичной лекарственной формы, предлагаемое в настоящем документе, может связываться с эпитопом или антителосвязывающей областью на человеческом B7H4, содержащими один или несколько из аминокислотных остатков S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245; нумерация каждого аминокислотного остатка соответствует его положению в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту осуществления антитело, предлагаемое в настоящем документе, может связываться с эпитопом или антителосвязывающей областью на человеческом B7H4, содержащими один или несколько из аминокислотных остатков V157, D158, Y159, E164, L166; нумерация каждого аминокислотного остатка соответствует его положению в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту осуществления антитело, предлагаемое в настоящем документе, может связываться с эпитопом или антителосвязывающей областью на человеческом B7H4, содержащими аминокислотные остатки S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245; нумерация каждого аминокислотного остатка соответствует его положению в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту осуществления антитело, предлагаемое в настоящем документе, может связываться с эпитопом или антителосвязывающей областью на человеческом B7H4, содержащими аминокислотные остатки V157, D158, Y159, E164, L166; нумерация каждого аминокислотного остатка соответствует его положению в SEQ ID NO: 1.

На основании результатов, представленных в примере 7 в настоящем документе, можно предположить, без попытки ограничения теорией, что любые один или несколько из этих аминокислотных остатков (то есть S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245) непосредственно участвуют в связывании антитела, например, посредством нековалентных взаимодействий; например, с аминокислотными остатками в последовательностях CDR антитела.

Аминокислотные остатки, содержащиеся в указанных эпитопе или антителосвязывающей области, и, необязательно, один или несколько дополнительных аминокислотных остатков, которые косвенно участвуют в связывании, могут быть идентифицированы путем аланинового сканирования человеческого В7Н4, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или последовательность внеклеточного домена согласно SEQ ID NO: 1. Аланиновое сканирование, в частности, может быть выполнено, как изложено или по существу как изложено в примере 7 в настоящем документе.

Кроме того, аланиновое сканирование может быть выполнено с помощью процедуры, предусматривающей стадии:

i) Экспрессии мутантных полипептидов человеческого В7Н4, в которых аминокислотные остатки во внеклеточном домене человеческого В7Н4 за исключением цистеинов и аланинов по отдельности заменены аланином, и соответствующих полипептидов В7Н4 дикого типа по отдельности в клетках человеческой эмбриональной почки, например в клетках НЕК 293, так что для каждого мутантного или дикого типа В7Н4 обеспечивается образец, содержащий 40-60000 клеток, например 50000 клеток,

ii) Инкубирования клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, причем указанное антитело состоит из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, причем это антитело помечено, например, подходящей меткой для анализа с помощью проточной цитометрии, такой как метка mNeogreen, и инкубировано в течение часа при комнатной температуре, последующего промывания с помощью буфера для FACS (например, фосфатно-солевого буфера [PBS; Lonza, каталожный номер BE17-517] + 0,1% [вес/об] BSA [Roche, каталожный номер 10735086001] + 0,02% [вес/об] азида натрия [ $\text{NaN}_3$ ; EMELCA Bioscience, каталожный номер 41920044-3]) и ресуспендирования клеток в каждом образце в 30 мкл буфера для FACS,

iii) Определения для каждого образца среднего количества антител, связанных на клетку, как среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции одиночных клеток в указанном образце и нормализации данных для каждого тестируемого антитела относительно интенсивности связывания не перекрестно блокирующего В7Н4-специфического эталонного антитела с использованием уравнения:

$$\text{Нормализованное gMFI}_{\text{aa position}} = \text{Log}_{10} \left( \frac{\text{gMFI}_{\text{Test Ab}}}{\text{gMFI}_{\text{Control Ab}}} \right),$$

где «aa position» обозначает положение, которое мутировало в аланин,

причем кратность изменения или Z-показатель рассчитывают для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с формулой:

$$\text{Кратность изменения} = \text{Log}_{10} \left( \frac{\text{Нормализованное gMFI}_{\text{ala mutant}}}{\text{Нормализованное gMFI}_{\text{wt}}} \right),$$

причем положения аминокислот, для которых при замене аминокислоты на аланин нет потери или усиления связывания конкретным антителом, дадут результат «0», усиление связывания приведет к результату «>0», а потеря связывания приведет к результату «<0», причем только аминокислотные остатки В7Н4, для которых кратность изменения связывания была ниже, чем средняя кратность изменения  $-1,5 \times \text{CO}$ , где CO представляет собой стандартное отклонение рассчитанных значений кратности изменения по четырем независимым экспериментам для конкретного тестируемого антитела, считали «мутантами с потерей связывания», и причем в случае, если gMFI эталонного антитела для конкретного мутанта В7Н4 было ниже, чем среднее gMFI  $-2,5 \times \text{CO}$  среднего gMFI<sub>Control Ab</sub>, данные исключали из анализа.

Кроме того, такое антитело также может представлять собой биспецифическое антитело, содержащее в дополнение к антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4, другую антигенсвязывающую область. Такая другая антигенсвязывающая область может представлять собой антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3. Такая антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, может представлять собой антигенсвязывающие области, способные связываться с CD3, как описано и раскрыто в настоящем документе.

Согласно другому варианту осуществления фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма согласно настоящему изобретению содержит биспецифическое антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа; и в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в таком биспецифическом антителе одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO: 60, и другая является такой, как определено в SEQ ID NO: 61, причем указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO: 63, и указанная

константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO: 64. Следует понимать, что, необязательно, у указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, могут быть удалены концевые лизины.

Особенно предпочтительным биспецифическим антителом фармацевтической композиции или единичной лекарственной формы согласно настоящему изобретению является описанное и используемое в разделе примеров, обозначенное BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

Следовательно, согласно предпочтительному варианту осуществления предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, которые содержат биспецифическое антитело, способное связывать человеческий CD3 и человеческий B7H4, содержащее:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим CD3, причем указанная первая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 17, и константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, как определено в настоящем документе, и причем указанная первая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 22, и константную область легкой цепи лямбда человека; и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим B7H4, причем указанная вторая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 29, и константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, как определено в настоящем документе, и причем указанная вторая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи каппа человека.

Следует понимать, что константные области тяжелой цепи IgG1 человека, как определено в настоящем документе, могут включать замены, как определено в настоящем документе (например, FEAR/FEAL), или аналогичные замены. Также следует понимать, что у константной области тяжелой цепи человеческого IgG1 может быть удален ее концевой лизин (K).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, которые содержат биспецифическое антитело, способное связывать человеческий CD3 и человеческий B7H4, содержащее:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим CD3, причем указанная первая тяжелая

цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 17, и константную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 60, и причем указанная первая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 22, и константную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 64; и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная вторая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 29, и константную область тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 61, и причем указанная вторая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 63.

Аналогично, следует понимать, что у константной области тяжелой цепи человеческого IgG1 может быть удален ее концевой лизин (К).

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, которые содержат биспецифическое антитело, способное связывать человеческий CD3 и человеческий В7Н4, содержащее:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим CD3, причем указанная первая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 17, и константной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 60, и причем указанная первая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 22, и константной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 64; и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная вторая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 29, и константной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 61, и причем указанная вторая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 33, и константной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 63.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления предлагаются фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, которые содержат биспецифическое антитело, способное связывать человеческий CD3 и человеческий В7Н4, содержащее:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим CD3, причем указанная первая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 17, и

константной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 60, с удаленным концевым лизином (K), и причем указанная первая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 22, и константной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 64; и

вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат область связывания, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная вторая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 29, и константной области тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 61, с удаленным концевым лизином (K), и причем указанная вторая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 33, и константной области легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 63.

### **Способы получения биспецифических антител**

При получении биспецифических антител согласно настоящему изобретению можно использовать традиционные способы, такие как способы гибридной гибридомы и химической конъюгации (Marvin and Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26:649). Совместная экспрессия в клетке-хозяине двух антител, состоящих из разных тяжелых и легких цепей, приводит к смеси возможных продуктов-антител в дополнение к желаемому биспецифическому антителу, которое затем можно выделить, например, с помощью аффинной хроматографии или аналогичных способов.

Также можно использовать стратегии, способствующие образованию функционального биспецифического продукта при совместной экспрессии различных конструкций антител, например способ, описанный Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155:219). Слияние гибридом крысы и мыши, продуцирующих разные антитела, приводит к ограниченному числу гетеродимерных белков из-за преимущественно ограниченного своим видом спаривания тяжелых/легких цепей. Другой стратегией, способствующей образованию гетеродимеров вместо гомодимеров, является стратегия «Knob-into-Hole», при которой вводят выступ в первый полипептид тяжелой цепи и соответствующую полость в полипептид второй тяжелой цепи, так что выступ может быть расположен в полости на границе этих двух тяжелых цепей, чтобы способствовать образованию гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера. «Выступы» конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе первого полипептида на более крупные боковые цепи. Компенсационные «полости» идентичного или подобного выступам размера создают на границе второго полипептида путем замены крупных боковых цепей аминокислот на меньшие (патент США 5731168). Документы EP1870459 (Chugai) и WO2009089004 (Amgen) описывают другие стратегии, способствующие

образованию гетеродимеров при совместной экспрессии различных доменов антител в клетке-хозяине. В этих способах один или несколько остатков, составляющих границу СНЗ-СНЗ в обоих доменах СНЗ, заменяют заряженной аминокислотой, так что образование гомодимера электростатически невыгодно, а гетеродимеризация электростатически выгодна. Документ WO2007110205 (Merck) описывает еще одну стратегию, в которой для стимулирования гетеродимеризации используются различия между доменами СНЗ IgA и IgG.

В документе WO2008119353 (Genmab) описан другой способ получения биспецифических антител *in vitro*, в котором биспецифическое антитело образуется путем обмена «Fab-плеча» или «полумолекулы» (обмен тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифическими IgG4 или IgG4-подобными антителами при инкубации в восстанавливающих условиях. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, содержащее два Fab-плеча, которые могут содержать различные последовательности.

Предпочтительный способ получения биспецифических антител к CD3×B7H4 согласно настоящему изобретению включает способы, описанные в документах WO2011131746 и WO13060867 (Genmab), предусматривающие следующие стадии:

а) предоставление первого антитела, содержащего Fc-область, причем указанная Fc-область содержит первую область СНЗ;

б) предоставление второго антитела, содержащего вторую Fc-область, причем указанная Fc-область содержит вторую область СНЗ, причем первое антитело представляет собой антитело к CD3, и второе антитело представляет собой антитело к B7H4 или наоборот;

причем последовательности указанных первой и второй областей СНЗ различны и таковы, гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ;

с) инкубирование указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях; и

д) получение указанного биспецифического антитела к CD3×B7H4.

Согласно одному варианту осуществления указанное первое антитело вместе с указанным вторым антителом инкубируют в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи, причем гетеродимерное взаимодействие между указанным первым и

вторым антителами в полученном гетеродимерном антителе является таким, что не происходит обмена Fab-плечей при 0,5 mM GSH через 24 часа при 37° C.

Без ограничения теорией на стадии с) дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях родительских антител восстанавливаются, и тогда полученные цистеины способны образовывать дисульфидные связи между тяжелыми цепями с остатками цистеина другой молекулы родительского антитела (изначально с другой специфичностью). Согласно одному варианту осуществления этого способа восстанавливающие условия на стадии с) предусматривают добавление восстанавливающего средства, например восстанавливающего средства, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина (2-MEA), дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), глутатиона, трис(2-карбоксиитил)фосфина (TCEP), L-цистеина и бета-меркаптоэтанола, предпочтительно, восстанавливающего средства, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиитил)фосфина. Согласно другому варианту осуществления стадия с) содержит восстановление условий до невозстанавливающих или менее восстанавливающих, например путем удаления восстанавливающего средства, например путем обессоливания.

Для этого способа можно использовать любые антитела к CD3 и B7H4, описанные в настоящем документе. Согласно конкретному варианту осуществления антитела к CD3 и B7H4, соответственно, могут быть выбраны так, чтобы получить биспецифическое антитело к CD3×B7H4, как описано в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления этого способа указанные первое и/или второе антитела представляют собой полноразмерные антитела.

Fc-области первого и второго антител могут относиться к любому изотипу, включая, но без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно одному варианту осуществления этого способа Fc-области обоих из указанного первого и указанного второго антитела относятся к изотипу IgG1. Согласно другому варианту осуществления одна из Fc-областей указанных антител относится к изотипу IgG1, а другая к изотипу IgG4. Согласно последнему варианту осуществления полученное биспецифическое антитело содержит Fc-область IgG1 и Fc-область IgG4 и, таким образом, может обладать интересными свойствами интермедиата в отношении активации эффекторных функций.

Согласно другому варианту осуществления один из исходных белков антитела сконструирован так, чтобы не связываться с белком А, что позволяет отделять гетеродимерный белок от указанного гомодимерного исходного белка путем пропускания продукта через колонку с белком А.

Как описано выше, последовательности первой и второй областей СНЗ гомодимерных исходных антител различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ. Более подробно эти взаимодействия и то, как их можно достичь, описано в документах WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab), которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

В частности, стабильное биспецифическое антитело к CD3×B7H4 может быть получено с высоким выходом с использованием описанного выше способа согласно настоящему изобретению на основе двух гомодимерных исходных антител, которые связывают CD3 и B7H4, соответственно, и содержат только несколько достаточно консервативных асимметричных мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

Согласно варианту осуществления предлагается способ получения антитела, способного связываться как с B7H4, так и с CD3 в соответствии с настоящим изобретением, предусматривающий стадии:

a) предоставления антитела, способного связываться с B7H4, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, как определено в настоящем документе;

b) предоставления антитела, способного связываться с CD3, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в настоящем документе;

c) инкубирования указанного антитела, способного связываться с B7H4, вместе с указанным антителом, способным связываться с CD3, в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидных связей, и

d) получения указанного антитела, способного связываться с B7H4 и CD3.

В таких способах стадии предоставления антитела, способного связываться с B7H4 и/или CD3, могут предусматривать стадии

- предоставления клеток, содержащих векторы экспрессии для продуцирования указанного антитела или указанных антител; и

- предоставления клеткам возможности продуцировать указанное антитело или указанные антитела и, затем,

- получения указанного антитела или указанных антител, тем самым предоставляя указанное антитело или указанные антитела.

Предпочтительно, антитело содержится в фармацевтически приемлемом носителе в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, нацеленное как на В7Н4, так и на CD3. Фармацевтическая композиция может также содержать антитело, нацеленное на В7Н4. Фармацевтическая композиция может также содержать комбинацию антител, включающую в себя антитело, нацеленное на В7Н4, и/или биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена, предпочтительно, для применения в качестве лекарственного средства. Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена, предпочтительно, для применения при лечении заболевания. Биспецифические антитела согласно настоящему изобретению можно применять для ряда целей. В частности, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных форм рака, включая метастатический рак и рефрактерный рак. Предпочтительно, рак может относиться к типу солидной опухоли.

В частности, биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть полезны в терапевтических условиях, когда желательно специфическое нацеливание и опосредованный Т-клетками киллинг клеток, которые экспрессируют В7Н4.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, причем данный способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к В7Н4×CD3 фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими В7Н4, у субъекта, причем данный способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, причем данный способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества антитела, способного связываться с человеческим В7Н4, согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими В7Н4, у субъекта, причем данный способ

предусматривает введение терапевтически эффективного количества моноспецифического антитела согласно настоящему изобретению, которое способно связываться с человеческим В7Н4.

Как уже было сказано, подходящие заболевания, которые можно рассматривать в способах и применениях в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой рак. Указанный рак, наиболее предпочтительно, характеризуется экспрессией В7Н4. Экспрессию В7Н4 при раке можно легко определить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как ПЦР, иммуноокрашивание или FACS-анализ, то есть с помощью обнаружения экспрессии транскрипта и/или белка В7Н4. Антитела, описанные в настоящем документе, которые способны связываться с человеческим В7Н4, можно использовать, например, в иммуноокрашивании и/или FACS-анализе или в аналогичных способах.

Виды рака, при которых может экспрессироваться В7Н4, включают рак молочной железы, рак матки/эндометрия, рак карциносаркому матки, рак яичников, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легких (плоскоклеточную карциному и аденокарциному), плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак пищевода, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почек и рак предстательной железы.

Виды рака, при которых может экспрессироваться В7Н4, включают такие виды рака, как раки желудка, холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легких (в частности, плоскоклеточный NSCLC), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы), рак яичников и рак матки. Типами рака, которые могут быть предпочтительными, являются раки, выбранные из карциносаркомы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы эндометрия тела матки (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичников (OV) и холангиокарциномы (CHOL).

Согласно другому варианту осуществления пациент, у которого диагностирован рак, может быть подвергнут оценке экспрессии В7Н4 в раковых клетках, и при обнаружении В7Н4, уровень которого может находиться в диапазоне от низкого до высокого, такой пациент может быть выбран для лечения с помощью антитела в соответствии с настоящим изобретением. Такому тесту могут быть подвергнуты пациенты, у которых диагностировано наличие рака желудка, холангиокарциномы, рака мочевого пузыря, немелкоклеточного рака легких (в частности, плоскоклеточного NSCLC), рака

поджелудочной железы, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы), рака яичников или рака матки. Согласно другому варианту осуществления такому тесту может быть подвергнут пациент, у которого диагностировано наличие карциносаркомы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы эндометрия тела матки (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичников (OV) или холангиокарциномы (CHOL). Однако требование включать такую оценку в отбор пациентов для лечения может быть не обязательным.

### **Наборы**

Настоящее изобретение дополнительно относится к набору компонентов, содержащему фармацевтическую композицию или единичную лекарственную форму, содержащие антитело, как раскрыто выше, такой как набор для применения в качестве сопутствующего диагностикума/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность отвечать на лечение с помощью антитела, как определено в настоящем документе выше, или иммуноконъюгата, или конъюгата антитело-лекарственное средство (antibody-drug conjugate, ADC), как определено в настоящем документе выше, или для прогнозирования эффективности или противоопухолевой активности указанного антитела, или иммуноконъюгата, или ADC при использовании в лечении пациента, причем данный набор содержит антитело, как определено выше; и инструкции по применению указанного набора.

Набор компонентов, такой как набор для применения в качестве сопутствующего диагностикума/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность отвечать на лечение с помощью антитела, как определено в любом из пп. 1-55, содержит антитело, как определено в любом из пп. 1-55; и инструкции по применению указанного набора.

Следовательно, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей биспецифическое антитело к CD3×B7H4, как определено в настоящем документе, или антитело к B7H4, как определено в настоящем документе, и к ее применению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору для обнаружения перекрестных соединений между экспрессирующими CD3 и B7H4 клетками в образце, полученном от пациента, содержащему

i) биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления, как раскрыто в настоящем документе; и

ii) инструкции по применению указанного набора.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для диагностики рака, содержащему контейнер, содержащий биспецифическое антитело к CD3×V7H4, и один или несколько реагентов для обнаружения перекрестных соединений экспрессирующих V7H4 клеток и экспрессирующих CD3 клеток. Реагенты могут включать, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие обнаруживаемые метки. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем ферментативные реакции дают продукт, который можно визуализировать.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу определения того, происходит ли перекрестное сшивание между клетками, экспрессирующими CD3 и экспрессирующими V7H4 в образце, полученном от пациента, при введении биспецифического антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, предусматривающему стадии:

- (i) приведения образца в контакт с биспецифическим антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между указанным биспецифическим антителом и экспрессирующими CD3 клетками и экспрессирующими V7H4 клетками; и
- (ii) проведение анализа, образовался ли комплекс.

### **Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим V7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, и

b) буферное средство,

причем pH данной композиции составляет от 4,0 до 8,0.

2. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 1, причем pH данной композиции составляет от 4,5 до 6,5.

3. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 1, причем pH данной композиции составляет от 5,0 до 6,0.

4. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой буферное средство выбрано из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей.

5. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, причем данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит с) неионогенное вспомогательное вещество.

6. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 5, в которой неионогенное вспомогательное вещество представляет собой сахар или сахарный спирт.

7. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления 5 или 6, в которой неионогенное вспомогательное вещество выбрано из сорбита, сахарозы или их смесей.

8. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 5-7, в которой неионогенное вспомогательное вещество присутствует в концентрации от 100 до 300 мМ, такой как 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ.

9. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления причем данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит d) поверхностно-активное вещество.

10. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 9, в которой поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из моноолеата глицерина, хлорида бензетония, докюзата натрия, фосфолипидов, алкиловых эфиров полиэтилена, лаурилсульфата натрия и трикаприлина, хлорида бензалкония, цетримиды, хлорида цетилпиридиния и фосфолипидов, альфа-токоферола, моноолеата глицерина, миристилового спирта, фосфолипидов, полуксамеров, алкиловых эфиров полиоксиэтилена, производных полиоксиэтиленового касторового масла, полиоксиэтиленовых эфиров сорбита и жирных кислот, полиоксиэтиленстеаратов, полиоксилгидроксистеарата, полиоксиглицеридов, полисорбатов, дилаурата пропиленгликоля, монолаурата пропиленгликоля, сложных эфиров сорбита, пальмитата сахарозы, стеарата сахарозы, трикаприлина и TPGS и их смесей.

11. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами осуществления 9 или 10, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

12. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 11, в которой полисорбат представляет собой полисорбат 20 или 80, предпочтительно полисорбат 80.

13. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-12, в которой поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,005% до 0,4% вес/об, например от около 0,01 до 0,1% вес/об, например от около 0,01 до 0,09% вес/об, например от около 0,01 до 0,06% вес/об, например от около 0,01 до 0,05% вес/об, например 0,02% вес/об, или 0,03% вес/об, или 0,04% вес/об, или 0,05% вес/об, предпочтительно 0,02% вес/об.

14. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой концентрация антитела составляет от 0,5 до 100 мг/мл, например от 1,0 до 50 мг/мл или например от 5 до 30 мг/мл, например 5 мг/мл, или 6 мг/мл, или 7 мг/мл, или 8 мг/мл, или 9 мг/мл, или 10 мг/мл, или 11 мг/мл, или 12 мг/мл, или 13 мг/мл, или 14 мг/мл, или 15 мг/мл, или 16 мг/мл, или 17 мг/мл, или 18 мг/мл, или 19 мг/мл, или 20 мг/мл, или 21 мг/мл, или 22 мг/мл, или 23 мг/мл, или 24 мг/мл, или 25 мг/мл, или 26 мг/мл, или 27 мг/мл, или 28 мг/мл, или 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или, например, 60 мг/мл.

15. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой буферное средство присутствует в концентрации от 5 до 40 мМ, например 10-30 мМ, предпочтительно 20 мМ.

16. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, причем данная фармацевтическая композиция представляет собой водную композицию.

17. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, содержащая:

- a) 5-50 мг/мл антитела,
- b) от 10 до 20 мМ глутамата или гистидина,
- c) от 150 до 350 мМ сорбита или сахарозы,
- d) полисорбат,

причем рН данной композиции составляет от 5,0 до 6,0.

18. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, выбранная из группы, состоящей из

фармацевтической композиции, содержащей a) 10-20 мг/мл антитела, b) 20 мМ глутамата, c) 250 мМ сорбита, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,1-5,3, и

фармацевтической композиции, содержащей а) 10-20 мг/мл антитела, б) 20 мМ гистидина, с) 250 мМ сахарозы, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,4-5,6.

19. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, причем данная композиция представляет собой жидкую композицию.

20. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-19, причем данная композиция представляет собой внутривенную композицию и/или причем данная композиция предназначена для применения при внутривенном введении.

21. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, причем данная композиция предназначена для применения при лечении рака.

22. Фармацевтическая композиция согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, которая находится в единичной лекарственной форме.

23. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, причем данная композиция является стабильной для фармацевтического применения в течение по меньшей мере 6 месяцев, например по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев, при температуре хранения 2-8°C, например 5°C.

24. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело представляет собой биспецифическое антитело.

25. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело способно связывать раковые клетки и Т-клетки.

26. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 25, причем раковые клетки экспрессируют указанный человеческий В7Н4.

27. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 25 или 26, причем раковые клетки принадлежат солидной опухоли.

28. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело способно индуцировать опосредованный Т-клетками киллинг клеток.

29. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связывать

CD3, способна связываться CD3ε (эпсилон) человека, такую как CD3ε (эпсилон) человека, как определено в SEQ ID NO: 13.

30. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 16 или согласно SEQ ID NO: 17,

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22.

31. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-29, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 18, 19 и 20 или 18, 19 и 21;

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24.

32. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-29, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17;

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22.

33. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой равновесная константа диссоциации  $K_D$  между антигенсвязывающей областью, которая связывается с CD3, и CD3 находится в диапазоне

1–100 нМ, например в диапазоне 5–100 нМ, в диапазоне 10–100 нМ, в диапазоне 1–80 нМ, в диапазоне 1–60 нМ в диапазоне 1–40 нМ, в диапазоне 1–20 нМ, в диапазоне 5–80 нМ, в диапазоне 5–60 нМ, в диапазоне 5–40 нМ, в диапазоне 5–20 нМ, в диапазоне 10–80 нМ, в диапазоне 10–60 нМ, в диапазоне 10–40 нМ или, например, в диапазоне 10–20 нМ.

34. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело характеризуется более низкой аффинностью связывания с CD3ε человека, чем антитело, содержащее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, как изложено в SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, как изложено в SEQ ID NO: 22, причем, предпочтительно, указанная аффинность по меньшей мере в 5 раз ниже, например, по меньшей мере в 10 раз ниже, например по меньшей мере в 20 раз ниже, по меньшей мере в 30 раз ниже, по меньшей мере в 40 раз ниже, по меньшей мере в 45 раз ниже или, например, по меньшей мере в 50 раз ниже.

35. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, характеризуется равновесной константой диссоциации  $K_D$ , которая находится в диапазоне 200–1000 нМ, например в диапазоне 300–1000 нМ, в диапазоне 400–1000 нМ, в диапазоне 500–1000 нМ, в диапазоне 300–900 нМ в диапазоне 400–900 нМ, в диапазоне 400–700 нМ, в диапазоне 500–900 нМ, в диапазоне 500–800 нМ, в диапазоне 500–700 нМ, в диапазоне 600–1000 нМ, в диапазоне 600–900 нМ, в диапазоне 600–800 нМ или, например, в диапазоне 600–700 нМ.

36. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

причем данная переменная область тяжелой цепи (VH) по сравнению с переменной областью тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, содержит аминокислотную замену, находящуюся в положении, выбранном из группы, состоящей из T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, причем положения пронумерованы в соответствии с последовательностью согласно SEQ ID NO: 16; и

переменная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 23, GTN и SEQ ID NO: 24, соответственно.

37. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 36, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит в

вариабельной области тяжелой цепи (VH) замену, выбранную из группы, состоящей из T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

38. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 30-32, в которой CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей согласно SEQ ID NO: 16, причем указанные аминокислотные замены включают, предпочтительно, аминокислотные замены, как определено в варианте осуществления 36 или варианте осуществления 37.

39. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой указанный человеческий B7H4 представляет собой человеческий B7H4 согласно SEQ ID NO: 1.

40. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, способна связываться с внеклеточным доменом человеческого B7H4.

41. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, способна связываться с IgC-подобной константной областью человеческого B7H4.

42. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, способна связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO: 11.

43. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 42, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO: 10.

44. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 69.

45. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержит:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 37, 38 и 39, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 41, DTS и SEQ ID NO: 42;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 44, 45 и 46, и переменную область легкой

цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 48, YTS и SEQ ID NO: 49;

е) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 51, 52 и 53, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 55, GAS и SEQ ID NO: 56; или

ф) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

г) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 70, GAS и SEQ ID NO: 71.

46. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит:

а) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

б) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

с) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

д) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

е) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

ф) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

г) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

47. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, характеризуется аффинностью связывания, которая соответствует значению  $K_D$   $5E-7$  М или меньше, например  $1E-7$  М или меньше, например аффинностью

связывания, соответствующей значению  $K_D$ , которое находится в диапазоне от  $5E-7$  до  $2E-10$  М, например в диапазоне от  $2E-7$  до  $1E-10$  М или от  $1E-7$  до  $5E-9$  М.

48. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 47, в которой аффинность связывания определяют с помощью биослойной интерферометрии, необязательно как изложено в примере 3 в настоящем документе.

49. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 47 и 48, в которой аффинность связывания определяют с использованием биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре захвата Fc IgG человека;

II) определения ассоциации в течение периода времени, составляющего 300 секунд, и диссоциации в течение периода времени, составляющего 1000 секунд, человеческого рекомбинантного меченного His белка В7Н4 (Sino Biological, каталожный номер 10738-Н08Н; белок, экспрессируемый из конструкции последовательности ДНК, кодирующей человеческий VTCN1 (номер доступа в Uniprot Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой) с использованием серии 2-кратных разведений в диапазоне от 1,56 нМ до 100 нМ.

III) сопоставления данных с контрольным буфером (0 нМ).

50. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 47-49, в которой аффинность связывания определяют с использованием антитела, как определено в любом из предшествующих вариантов осуществления, которое представляет собой моноспецифическое бивалентное антитело, такое как антитело, которое представляет собой полноразмерный IgG1.

51. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенную область, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33; и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40; и

причем указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; и

антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

52. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенную область, способную связываться с человеческим B7H4, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47,

антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; и

антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69;

и причем указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию антитела, содержащего

антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33 и

антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40.

53. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, способна связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC согласно SEQ ID NO: 11 и, необязательно, не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC согласно SEQ ID NO: 10.

54. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой каждая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), и в которой каждая из указанных вариабельных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

55. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой

антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, является человеческой и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

56. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой

антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, является человеческой и/или

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

57. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

58. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 57, в которой два константных домена тяжелой цепи и две константные области легкой цепи имеют человеческое происхождение.

59. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело представляет собой полноразмерное антитело.

60. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело имеет изотип IgG1.

61. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем каждая из указанных первой и второй тяжелых цепей содержит по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и CH3, причем в указанной первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и в указанной второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, причем указанные замены в указанной первой и указанной второй тяжелых цепях сделаны не в одних и тех же положениях, и причем положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией Eu.

62. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 61, в которой аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в

положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

63. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит первую и, необязательно, вторую тяжелые цепи, причем данные первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь, если присутствует, модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с идентичным немодифицированным антителом.

64. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 63, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляют собой F и E, соответственно.

65. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 63 или вариантом осуществления 64, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляет собой A.

66. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит легкую цепь каппа ( $\kappa$ ).

67. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит легкую цепь лямбда ( $\lambda$ ).

68. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит легкую цепь лямбда ( $\lambda$ ) и легкую цепь каппа ( $\kappa$ ); например антитело с тяжелой цепью и легкой цепью лямбда, которые содержат область связывания, способную связываться с CD3, и с тяжелой цепью и легкой цепью каппа, которые содержат область связывания, способную связываться с B7H4.

69. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа; и в которой указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и

указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда.

70. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 69, в которой одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO: 60, и другая является такой, как определено в SEQ ID NO: 61, и в которой указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO: 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO: 64.

71. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 70, в которой у указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, удалены их концевые лизины.

72. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело лишено Fc-опосредованной эффекторной функции, или эта функция снижена, и данное антитело:

а) способно связываться с экспрессирующими B7H4 человеческими опухолевыми клетками, как описано в примере 9 и 10 в настоящем документе,

б) опосредует зависимость от концентрации цитотоксичность в отношении экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток при использовании, например, РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе,

с) способно опосредовать зависимость от концентрации цитотоксичность в одной или нескольких линиях человеческих экспрессирующих B7H4 опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, при использовании, например, РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе,

д) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток; например при анализе, как описано в примере 13 в настоящем документе,

е) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии одной или нескольких линий экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650; например при анализе, как описано в примере 13 в настоящем документе,

ф) способно индуцировать цитотоксичность в отношении экспрессирующих B7H4 человеческих опухолевых клеток; например при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе, и/или

г) способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность в одной или нескольких линиях экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650; например при анализе, как описано в примерах 11 и 12 в настоящем документе.

73. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело характеризуется IC50 в диапазоне 0,001–5 микрограмм/мл, причем IC50 определяют с помощью анализа цитотоксичности *in vitro*, предусматривающего стадии:

i) предоставления выделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или очищенных Т-клеток из светлых слоев здорового донора-человека,

ii) предоставления экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток;

iii) объединения PBMC или очищенных Т-клеток и линии человеческих экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток, выбранной из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, в несколько образцов, причем соотношение количества Т-клеток из указанных PBMC или очищенных Т-клеток и выбранных опухолевых клеток составляет 8:1;

iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в диапазоне, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл и

v) инкубирования образцов, например, в течение 72 часов при 37°C; и, затем,

vi) оценки жизнеспособности экспрессирующих В7Н4 опухолевых клеток,

vii) определения процентной доли жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и

viii) определения IC50.

74. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 73, в которой IC50 находится в диапазоне 0,001–0,03 микрограмм/мл.

75. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 73, в которой IC50 находится в диапазоне от 0,05–5 микрограмм/мл.

76. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, причем указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

e) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

77. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело представляет собой бивалентное антитело.

78. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 18, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 19 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 21.

79. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 23, в которой CDR2 представляет собой GTN и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 24.

80. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная

связываться с В7Н4, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 26, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 30 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 28.

81. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 34, в которой CDR2 представляет собой GAS и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 35.

82. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 18, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 19 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 21, и

вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 23, в которой CDR2 представляет собой GTN и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 24, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 26, в которой CDR2 соответствует SEQ ID NO: 30 и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 28, и

вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 соответствует SEQ ID NO: 34, в которой CDR2 представляет собой GAS и в которой CDR3 соответствует SEQ ID NO: 35.

83. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33.

84. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в которой антитело представляет собой bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или его биоаналог.

85. Фармацевтическая композиция, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84, для применения в качестве лекарственного средства.

86. Фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства в соответствии с вариантом осуществления 85 для применения в способе лечения заболевания.

87. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 86, причем заболевание представляет собой рак.

88. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 87, причем рак характеризуется экспрессией B7H4 в раковых клетках.

89. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 88, причем указанную экспрессию B7H4 определяют в раковых клетках, полученных от пациента.

90. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с вариантами осуществления 87-89, причем рак представляет собой солидную опухоль.

91. Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 87-90, причем рак выбран из группы, состоящей из рака легких, NSCLC (ADC или SQCC), рака желудка, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака яичников и рака матки.

92. Способ лечения заболевания, причем данный способ предусматривает введение фармацевтической композиции, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84, нуждающемуся в этом субъекту.

93. Способ в соответствии с вариантом осуществления 92, причем указанный способ предназначен для лечения рака.

94. Способ в соответствии с вариантом осуществления 93, причем рак выбран из группы, состоящей из карциносаркомы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легких (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы эндометрия тела матки (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичников (OV) и холангиокарциномы (CHOL).

95. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-84 в течение времени, достаточного для лечения данного рака.

96. Способ согласно варианту осуществления 95, в котором данную композицию вводят внутривенно.

97. Применение фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-84 для лечения рака.

98. Применение фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-84 или 97, причем данное применение представляет собой применение для внутривенного введения.

99. Единичная лекарственная форма, содержащая

а) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, в количестве от 5 пг до 1200 мг,

и

б) буферное средство, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей,

причем рН данной единичной лекарственной формы составляет от 4,0 до 8,0, предпочтительно от 4,5 до 6,5, более предпочтительно от 5,0 до 6,0.

100. Единичная лекарственная форма согласно варианту осуществления 99, в которой антитело является таким, как определено в любом из вариантов осуществления 24-84.

101. Единичная лекарственная форма согласно вариантам осуществления 99 или 100, в которой количество антитела составляет от 20 мг до 1000 мг.

102. Единичная лекарственная форма согласно любому из вариантов осуществления 99-101, в которой количество антитела составляет от 40 мг до 1000 мг, например 40 мг, 50

мг, 100 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг или, например, 1 г.

103. Единичная лекарственная форма согласно любому из вариантов осуществления 99-102, в которой общий объем составляет от 20 мл до 200 мл, причем данная лекарственная форма предназначена для в/в введения.

104. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту единичной лекарственной формы согласно любому из вариантов осуществления 99-103 в течение времени, достаточного для лечения данного рака.

105. Единичная лекарственная форма согласно любому из вариантов осуществления 99-103 для применения в лечении рака.

106. Контейнер, содержащий единичную лекарственную форму согласно любому из вариантов осуществления 99-103 или фармацевтическую композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-84.

107. Набор компонентов, содержащий:

a. фармацевтическую композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-84 или единичную лекарственную форму согласно любому из вариантов осуществления 99-103,

b. емкость для фармацевтической композиции или для единичной лекарственной формы,

c. инструкции по разбавлению и/или по применению.

108. Набор компонентов, содержащий:

a. фармацевтическую композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-84 или единичную лекарственную форму согласно любому из вариантов осуществления 99-103,

b. разбавитель,

c. емкость для единичной лекарственной формы и

d. инструкции по разбавлению и/или по применению.

109. Набор компонентов, такой как набор для применения в качестве сопутствующего диагностикума/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность отвечать на лечение с помощью фармацевтической композиции, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84, содержащий фармацевтическую композицию, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84; и инструкции по применению указанного набора.

110. Способ получения фармацевтической композиции, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84, содержащий стадии смешивания в воде для инъекций:

- a. от 0,5 до 120 мг/мл антитела и
  - b. буферного средства
- и доведения pH до 4,0-8,0, предпочтительно до 5,0-6,0.

111. Способ получения единичной лекарственной формы, как определено в любом из вариантов осуществления 99-103, предусматривающий стадии:

a. получения фармацевтической композиции с помощью стадий способа согласно варианту осуществления 110 или предоставления фармацевтической композиции, как определено в любом из вариантов осуществления 1-84;

b. предоставления разбавителя

c. смешивания фармацевтической композиции и разбавителя до желаемой концентрации антитела.

112. Фармацевтическая композиция или единичная лекарственная форма, которые можно получать с помощью любого из способов, определенных в вариантах осуществления 110 или 111.

### **Примеры**

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

#### **Пример 1. Получение антител к B7H4 и материалов для скрининга**

##### *Экспрессия конструкций B7H4*

Были созданы конструкции, кодирующие различные полноразмерные варианты B7H4: B7H4 человека (*Homo sapiens*) (номер доступа в Uniprot Q7Z7D3), транскрипт 1 B7H4 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (номер доступа в Uniprot A0A2K5U6P5), B7H4 собаки (*Canis familiaris*) (номер доступа в Uniprot F1P8R9), B7H4 кролика (*Oryctolagus cuniculus*) (номер доступа в Uniprot G1TQE8), B7H4 крысы (*Rattus norvegicus*) (номер доступа в Uniprot Q501W4), B7H4 мыши (*Mus musculus*) (номер доступа в Uniprot Q7TSP5) и B7H4 свиньи (*Sus scrofa*) (номер доступа в Uniprot F1SAY4) (смотри таблицу 1).

Кроме того, была создана конструкция внеклеточного домена (extracellular domain, ECD) человеческого B7H4 (а. к. 25-259 номера доступа Q7Z7D3 в Uniprot), слитого с доменом Fc IgG1 человека с С-концевой His-меткой и С-меткой (B7H4ECD-FcHisC) (SEQ ID NO: 12). В SEQ ID NO: 1 аминокислотные остатки 1-24 представляют собой сигнальный пептид; следовательно, зрелый белок B7H4ECD-FcHisC соответствует аминокислотным остаткам 25-259 согласно SEQ ID NO: 1.

Конструкции содержали подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную (GCCGCCACC) последовательность Козак (Kozak, M., Gene 1999;234(2):187-208). Конструкции полноразмерного В7Н4 и ECD В7Н4 клонировали в рSB, векторе экспрессии млекопитающих, содержащем инвертированные концевые повторы «Спящая красавица», фланкирующие кассету экспрессии, состоящую из промотора CMV и поли-А-сигнала HSV-ТК.

*Создание клеточных линий HEK-293F, временно экспрессирующих полноразмерные варианты В7Н4*

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон HEK-293, адаптированный к суспензионному росту и среде с химически определенным составом Freestyle [HEK-293F]) получали от Invitrogen (каталожный номер R790-07) и трансфицировали конструкциями, описанными выше, с использованием 293fectin (Invitrogen, каталожный номер 12347-019) в соответствии с инструкциями производителя.

*Очистка His-меченного В7Н4*

В7Н4ECD-FcHisC экспрессировали с использованием платформы экспрессии Expi293F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США, каталожный номер A14527), по существу как описано производителем.

His-метка позволяет проводить очистку с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом Ni-NTA. His-меченный белок прочно связывается с материалом колонки, в то время как другие белки, присутствующие в культуральном супернатанте, не связываются или связываются слабо по сравнению с His-мечеными белками и элюируются в проточном режиме. Колонку промывали, для того чтобы удалить слабо связанные белки. Прочно связанные His-меченные белки затем элюировали буфером, содержащим имидазол, который конкурирует со связыванием His с Ni<sup>2+</sup>. Элюент удаляли путем замены буфера на обессоливающей колонке.

*Иммунизация*

Животных OmniRat® (трансгенные крысы, экспрессирующие разнообразный набор антител с полностью человеческими идиотипами; Ligand Pharmaceuticals Inc., Сан-Диего, США) иммунизировали путем подкожных инъекций в скакательные суставы обеих задних конечностей (два раза в неделю в течение 7 недель) 50 мкг В7Н4ECD-FcHisC в PBS, смешанном с равным объемом адьюванта (адьювантная система Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США, каталожный номер S6322) или CFA, полный адьювант Фрейнда (Complete Freund Adjuvant), (1-ая инъекция) и IFA, неполный адьювант Фрейнда (Incomplete Freund Adjuvant), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США, каталожный номер F5881/F5506)

(последующие инъекции), с последующей п/к бустер-инъекцией антигена в PBS без адьюванта.

#### *Получение антител*

Клетки лимфатических узлов иммунизированных животных сливали с клетками мышиной миеломы SP2.0 в соответствии со стандартными процедурами через 3 дня после последнего бустера. Экстрагировали РНК из гибридом, продуцирующих В7Н4-специфическое антитело, и получали 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) из 100 нг общей РНК с использованием набора для амплификации кДНК SMART RACE (Clontech), в соответствии с инструкциями производителя. Кодированные области VH и VL амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали непосредственно в рамке в векторах экспрессии p33G1f, p33Карпа и p33Lambda (векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированными константными доменами человеческих IgG1m(f), каппа и лямбда, соответственно) путем безлигазного клонирования (Aslanidis, C. and P.J. de Jong, *Nucleic Acids Res* 1990;18(20): 6069-74). Секвенировали переменные домены этих векторов экспрессии, и аннотировали CDR в соответствии с определениями IMGT (Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999, и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)). Клоны с правильной открытой рамкой считывания (Open Reading Frame, ORF) экспрессировали и тестировали на связывание с антигеном. После проведения анализа специфического к антигену скрининга последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей генетически синтезировали и клонировали в вектор экспрессии, включающий в себя тяжелую цепь человеческого IgG1, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и K409R (FEAR), причем номер положения аминокислоты соответствует нумерации Eu (соответствует SEQ ID NO 60), и в векторы экспрессии, включающие в себя человеческую легкую цепь каппа или лямбда. Для некоторых антител был создан вариант с точечной мутацией в переменных доменах для удаления остатка цистеина, который потенциально мог вызывать образование нежелательного дисульфидного мостика, или для замены аспарагина на серин или остаток зародышевого типа для удаления потенциального сайта N-связанного гликозилирования. Например, из последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей C1 был создан вариант с заменой N52S, соответствующей замене в CDR2 (смотри таблицу 1, SEQ ID NO: 25 и 29), а другой вариант может содержать замену N52Q (SEQ ID NO: 31).

#### *Анализ специфического к антигену скрининга*

Присутствие антител к В7Н4 в сыворотке иммунизированных животных или супернатанте культур гибридом и трансфектом определяли с помощью гомогенного анализа связывания. Образцы анализировали на связывание антител с клетками HEK-293F,

временно трансфицированными конструкциями, созданными для экспрессии полноразмерных вариантов В7Н4, экспрессирующими человеческий В7Н4, В7Н4 яванского макака или мышиный В7Н4, или с клетками НЕК-293F дикого типа (отрицательный контроль). Образцы добавляли к клеткам, чтобы обеспечить связывание антитела с В7Н4. Затем связывание антител детектировали с использованием соответствующего флуоресцентного конъюгата (AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 647; Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 112-605-143; AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647; Jackson ImmunoResearch, каталожный номер 109-605-098). Клетки ( $2,5 \times 10^5$  клеток на мл) смешивали с козьим антителом к человеческому антителу AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647 (0,2 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-098) или AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 647 (0,2 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch, 112-605-143) в зависимости от остова антитела. Готовили серийные разведения тестируемых и контрольных антител (диапазон от 0,003 до 3 мкг/мл с 2-кратным шагом разведения), и 2 мкл разведения антител добавляли к 5 мкл смеси клетка/конъюгат в 1536-луночных планшетах (Greiner, каталожный номер 789866). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 9 часов, после этого определяли интенсивность флуоресценции с использованием лазерного сканирующего цитометра ImageXpress Velos (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, США), и в качестве результата использовали общую флуоресценцию. Образцы считали положительными, если количество превышало 50 и количество, умноженное на флуоресценцию, было по меньшей мере в три раза выше, чем в отрицательном контроле.

#### *Результаты создания панели антител к В7Н4*

Из 176 из 193 полученных гибридом были успешно получены последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей. Из 351 протестированной комбинации тяжелая цепь/легкая цепь 98 показали связывание в анализах скрининга антигенов с использованием трансфицированных человеческим В7Н4 клеток НЕК-293F, как описано выше. Было отобрано 35 антител: 26 с оригинальными последовательностями и 9 вариантов с точечными мутациями, введенными в переменные домены. Антитела получали в виде моновалентных связывающих антител (в виде биспецифических к CD3) и бивалентных связывающих антител (в виде молекул IgG1) и тестировали на связывание с опухолевыми клетками, как описано ниже. Из антител из полученной панели только антитело В7Н4-С1 и его вариант В7Н4-С1-N52S, для которых соответствующие последовательности, кодирующие переменные домены VH и VL антител, приведены в таблице 1, обеспечивают антитела, которые связываются с опухолевыми клетками, как описано ниже.

#### *Дополнительные антитела к В7Н4*

В примерах использовали дополнительные антитела, специфичные к B7H4, содержащие переменные домены, ранее описанные в документе WO2014159835 (обозначены в нем как SEQ ID NO 38 и 35), соответствующие в настоящем документе B7H4-C2, соответствующие последовательности переменных доменов приведены в настоящем документе в таблице 1 и включают SEQ ID NO: 43 и 47; в документе WO2014159835 (обозначенные в нем как SEQ ID NO 56 и 55), соответствующие в настоящем документе B7H4-C3, соответствующие последовательности переменных доменов приведены в настоящем документе в таблице 1 и включают SEQ ID NO: 36 и 40; в документе WO2009073533 (обозначены в нем как SEQ ID NO: 2 и 7), соответствующие в настоящем документе B7H4-C4, и соответствующие последовательности переменных доменов приведены в настоящем документе в таблице 1 и включают SEQ ID NO: 50 и 54; и в документе US20190085080A1, соответствующие в настоящем документе B7H4-C5, и соответствующие последовательности переменных доменов приведены в настоящем документе в таблице 1 и включают SEQ ID NO: 65 и 69. Соответствующие последовательности, кодирующие переменные домены VH и VL антител, были синтезированы и клонированы в векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированными константными доменами человеческих IgG1m(f) и каппа или лямбда или их вариантами для получения моноспецифических и биспецифических антител. Когда дана ссылка на антитело IgG1-B7H4-CX -FEAL, это означает антитело, содержащее переменные области B7H4-CX, принадлежащее к изотипу IgG1 и содержащее аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и F409R в константной области тяжелой цепи.

#### *Антитело IgG1-b12*

Антитело b12, специфичное к gp120 ВИЧ-1 антитело (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23), использовали в некоторых примерах в качестве IgG1 отрицательного контроля или в качестве несвязывающего контрольного Fab-плеча биспецифического контроля. Кодон-оптимизированные кодирующие антитело последовательности для этого контрольного антитела были синтезированы и клонированы в векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированными константными доменами человеческих IgG1m(f) и каппа или их вариантами. Последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) и последовательность переменной области легкой цепи (VL) включены в настоящий документ как SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно.

#### **Пример 2. Гуманизированные антитела к CD3 для получения биспецифических антител к CD3×B7H4**

Получение гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1 (для которого последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей приведены в настоящем документе в SEQ ID NO: 16 и 22) описано в примере 1 документа WO2015/001085. IgG1-huCD3-H1L1 обозначено в настоящем документе как «IgG1-huCD3». Антитело IgG1-huCD3-H1L1-FEAL представляет собой его вариант с тремя аминокислотными заменами в Fc-доме (L234F, L235E, D265A) в дополнение к аминокислотной замене, которая обеспечивает получение биспецифических антител посредством контролируемого обмена Fab-плеч (F405L), как описано в настоящем документе ниже. Было показано, что такие мутации не влияют на связывание с мишенью антител, в которые они введены (смотри, например, документы US 2015/0337049 и Engelberts et al., 2020, EBioMedicine 52: 102625).

Получение гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1-H101G (для которого последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи приведены как SEQ ID NO: 17 и 22 в настоящем документе) описано в примере 2 документа WO2017/009442. IgG1-huCD3-H1L1-H101G будет обозначаться как «IgG1-huCD3-H101G». Этот вариант содержит замену H101G в последовательности переменной области тяжелой цепи (сравните SEQ ID NO: 16 и 17) и содержит ту же легкую цепь, что и IgG1-huCD3-H1L1. Антитело IgG1-huCD3-H101G-FEAL представляет собой его вариант с аминокислотными заменами L234F, L235E, D265A и F405L.

### **Пример 3. Определение аффинности связывания B7H4 с использованием биослойной интерферометрии**

Аффинность связывания антител к B7H4 с мишенью определяли с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии (BLI) на приборе Octet HTX (FortéBio). Эксперименты проводили при встряхивании со скоростью 1000 об/мин при 30°C. Первоначально определяли аффинность IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C4-FEAR к B7H4 человека и мыши с использованием BLI. Биосенсоры захвата Fc IgG человека (Anti-Human IgG Fc Capture, АНС) (FortéBio, каталожный номер 18-5060) предварительно кондиционировали путем воздействия 10 мМ глицинового (Sigma-Aldrich, каталожный номер 15527) буфера с pH 1,7 в течение 5 с. с последующей нейтрализацией в разбавителе образцов (FortéBio, каталожный номер 18-1048) в течение 5 с.; обе стадии повторяли 2 раза. Затем сенсоры АНС нагружали антителом (1 мкг/мл в разбавителе образцов) в течение 600 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образцов (100 с.), ассоциацию (300 с.) и диссоциацию (1000 с.) человеческого B7H4 (Sino Biological, каталожный номер 10738-H08H-100) или мышиного B7H4 (R&D

Systems, каталожный номер 2154-B7-050) определяли в диапазоне концентраций 1,56–100 нМ (0,04–2,68 мкг/мл) и 5,9–375 нМ (0,16–10 мкг/мл) для человеческого и мышинового В7Н4, соответственно, с двукратным шагом разведения в разбавителе образцов. Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу человеческого В7Н4 и мышинового (в виде меченных ECD-His молекул), исходя из их аминокислотных последовательностей (26,8 кДа и 26,6 кДа, соответственно). Для каждого антитела использовали эталонный сенсор, который инкубировали с разбавителем образцов вместо антигена. Сенсоры АНС регенерировали воздействием 10 мМ глицинового буфера с рН 1,7 в течение 5 с. с последующей нейтрализацией в разбавителе образцов в течение 5 с.; обе стадии повторяли дважды. Затем сенсоры снова загружали антителом для следующего цикла измерений кинетики.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных версии 9.0.0.12 (FortéBio). Следы данных корректировали для каждого антитела путем вычитания эталонного сенсора. Ось Y выравнивали по последним 10 с. исходного уровня, применяли корректирующее выравнивание по диссоциации между шагами и фильтрацию Савицкого-Голая. Следы данных с откликом <0,05 нм исключали из анализа. Данные аппроксимировали с помощью модели полного глобального соответствия 1:1 с использованием окна интереса для времен ассоциации и диссоциации, установленного на 300 с. и 200 с., соответственно.

Во втором эксперименте определяли аффинность IgG1-B7Н4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7Н4-C2-FEAR, IgG1-B7Н4-C3-FEAR, IgG1-B7Н4-C4-FEAR и IgG1-B7Н4-C5-FEAR к человеческому и мышинному В7Н4 с использованием BLI. Эксперимент проводили, как описано выше, за некоторыми небольшими исключениями. Стадии предварительного кондиционирования повторяли 5 раз. Ассоциацию (200 с.) и диссоциацию (1000 с.) человеческого или мышинового В7Н4 определяли в диапазоне концентраций 0,78–800 нМ с двукратным шагом разведения в разбавителе образцов. Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 12.0.1.8 (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных версии 12.0.1.2 (FortéBio). Данные аппроксимировали с помощью модели полного глобального соответствия 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации 200 с. и окна интереса для времени диссоциации 200 с., за исключением IgG1-B7Н4-C2-FEAR, для которого использовали время диссоциации 1000 с. Время диссоциации выбирали на основе значения  $R^2$ , визуального контроля кривой и затухания сигнала по меньшей мере на 5% во время стадии

диссоциации. Следы данных, полученные при концентрациях антигена выше 100 нМ, исключали из анализа для антител с аффинностью ниже 50 нМ.

Кроме того, с помощью BLI определяли аффинность к В7Н4 яванского макака. В первом эксперименте определяли аффинность bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C4-FEAR к В7Н4 яванского макака. Биосенсоры Amine Reactive 2-го поколения (AR2G) (FortéBio, каталожный номер 18-5092) активировали реакцией с 20 мМ EDC (гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида) (FortéBio, каталожный номер 18-1033) и 10 мМ s-NHS (натриевая соль N-гидроксисульфосукцинимид) (FortéBio, каталожный номер 18-1067) в течение 300 с. Активированные сенсоры нагружали 10 мкг/мл рекомбинантного меченного Fc hIgG1 В7Н4 яванского макака (Creative BioMart, каталожный номер VTCN1-1517R) в 10 мМ ацетата натрия с рН 4,0 (FortéBio, каталожный номер 18-1068) в течение 600 с. и гасили 1 М этаноламина с рН 8,5 (FortéBio, каталожный номер 18-1071) в течение 300 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образцов (300 с.; FortéBio, каталожный номер 18-1048) определяли ассоциацию (100 с.) и диссоциацию (1000 с.) функционально моновалентного связывания В7Н4 биспецифическими антителами к CD3×В7Н4 (как показано в таблице 8) в диапазоне концентраций 0,23–15 мкг/мл (1,56–100 нМ) с двукратным шагом разведения в разбавителе образцов. Для расчетов использовали молекулярную массу антител 150 кДа. Для каждого антитела использовали эталонный сенсор, который инкубировали с разбавителем образцов вместо антитела.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных версии 9.0.0.12 (FortéBio). Следы данных корректировали для каждого антитела путем вычитания эталонного сенсора. Ось Y выравнивали по последним 10 с. исходного уровня, применяли корректирующее выравнивание по диссоциации между шагами и фильтрацию Савицкого-Голая. Следы данных с откликом <0,05 нм исключали из анализа. Данные аппроксимировали с помощью модели полного глобального соответствия 1:1 с использованием окна интереса для времен ассоциации и диссоциации, установленного на 100 с. и 200 с., соответственно.

Во втором эксперименте, чтобы определить аффинность к В7Н4 яванского макака для антител к В7Н4, определяли аффинность bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR. Эксперимент проводили, как описано выше, за некоторыми небольшими исключениями. После измерения исходного уровня в разбавителе образцов в течение 600 с. определяли ассоциацию (200 с.) и

диссоциацию (1000 с.) функционально моновалентного связывания В7Н4 биспецифическими антителами к CD3×В7Н4 (как показано в таблице 9) в диапазоне концентраций приблизительно 0,1–116 мкг/мл (0,78–800 нМ) с двукратным шагом разведения в разбавителе образцов. Для расчетов использовали заданную молекулярную массу каждого антитела (приблизительно 145 кДа). Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 12 (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных версии 12 (FortéBio). Следы данных с откликом <0,03 нМ исключали из анализа. Данные аппроксимировали с помощью модели полного глобального соответствия 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации и времени диссоциации 200 с. Время диссоциации выбирали на основе значения  $R^2$ , визуального контроля кривой и затухания сигнала по меньшей мере на 5% во время стадии диссоциации. Следы данных, полученные при концентрациях антител выше 200 нМ, исключали из анализа для антител с аффинностью ниже 50 нМ. Все результаты были определены с  $R^2$  по меньшей мере 0,98.

« $K_D$ » (М) относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антитело-антиген, и ее получают путем деления  $k_d$  на  $k_a$ . « $k_d$ » (сек<sup>-1</sup>) относится к константе скорости диссоциации взаимодействия антитело-антиген. Ее иногда также называют значением  $k_{off}$  или скоростью распада. « $k_a$ » (М<sup>-1</sup>×с<sup>-1</sup>) относится к константе скорости ассоциации взаимодействия антитело-антиген. Ее иногда также называют значением  $k_{on}$  или скоростью образования.

В таблицах 4 и 5 показаны результаты первого и второго экспериментов, в которых были определены константа скорости ассоциации  $k_a$  (1/Мс), константа скорости диссоциации  $k_d$  (1/с) и равновесная константа диссоциации  $K_D$  (М) указанных антител для человеческого В7Н4 с помощью биослойной интерферометрии.

Таблица 4. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом человеческого В7Н4, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии. Н/о = не определено.

Антитело	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Мс)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
IgG1-B7H4-C1-FEAR	н/о	н/о	н/о
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	9,4E+04	5,4E-03	5,7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5,2E+04	8,8E-04	1,7E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	9,9E+04	4,1E-03	4,2E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	1,5E+05	1,6E-03	1,1E-08

Таблица 5. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом человеческого В7Н4, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

Антитело	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Мс)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR <sup>1</sup>	8,4E+04	4,7E-03	5,7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5,9E+04	1,7E-04	3,0E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	8,1E+04	4,4E-03	5,4E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	2,2E+05	1,7E-03	7,9E-09
IgG1-B7H4-C5-FEAR	2,5E+05	2,5E-03	9,9E-09

<sup>1</sup> Показаны усредненные результаты n=3 экспериментов.

В таблицах 6 и 7 показаны результаты двух экспериментов, в которых были определены  $k_a$  (1/Мс),  $k_d$  (1/с) и  $K_D$  (М) указанных антител для мышинового В7Н4 с помощью биослойной интерферометрии.

Таблица 6. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом мышинового В7Н4, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии. Н/о = не определено; - = связывание отсутствует (отклик <0,05 нм при самой высокой используемой концентрации).

Антитело	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Мс)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
IgG1-B7H4-C1-FEAR	н/о	н/о	н/о
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	3,3E+04	7,7E-04	2,4E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5,1E+04	2,0E-02	3,9E-07
IgG1-B7H4-C4-FEAR	8,4E+04	1,4E-03	1,6E-08

Таблица 7. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом мышинового В7Н4, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии. - = связывание отсутствует (отклик <0,05 нм при самой высокой используемой концентрации).

Антитело	Скорость ассоциации	Скорость диссоциации	$K_D$ (М)
----------	---------------------	----------------------	-----------

	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	6,3E+04	1,3E-04	2,1E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5,9E+04	1,8E-02	3,0E-07
IgG1-B7H4-C4-FEAR	1,4E+05	1,4E-03	9,7E-09
IgG1-B7H4-C5-FEAR	1,7E+05	2,4E-03	1,4E-08

В таблицах 8 и 9 показаны результаты двух экспериментов, в которых были определены  $k_a$  (1/Mc),  $k_d$  (1/c) и  $K_D$  (M) указанных антител B7H4 для яванского макака с помощью биослойной интерферометрии.

Таблица 8. Аффинность связывания функционально моновалентных антител с внеклеточным доменом B7H4 яванского макака, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

Антитело	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Mc)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR	2,7E+05	1,4E-03	5,1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR	1,4E+05	3,0E-03	2,1E-08
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR	1,3E+05	4,1E-04	3,1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR	2,8E+05	4,1E-03	1,5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR	3,5E+05	1,5E-03	4,2E-09

Таблица 9. Аффинность связывания функционально моновалентных антител с внеклеточным доменом B7H4 яванского макака, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

Антитело	$R^2$	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Mc)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/c)	$K_D$ (M)
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR <sup>a</sup>	0,99	1,2E+05	2,7E-03	2,5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR <sup>b</sup>	0,97	4,2E+05	2,5E-03	6,0E-09

<sup>a</sup> Показаны усредненные результаты  $n=3$  экспериментов.

<sup>b</sup> Не соответствует строгому контролю качества порога 0,98 для  $R^2$ .

**Пример 4. Определение аффинности связывания CD3 с использованием биослойной интерферометрии**

Аффинность связывания IgG1-huCD3-FEAL и IgG1-huCD3-H101G-FEAL определяли, как описано в примере 7 документа WO2017/009442.

В кратком изложении, определяли аффинность связывания выбранных антител к CD3 в формате IgG1-huCD3-FEAL с рекомбинантной растворимой CD3ε (CD3E27-GSKa) (зрелый белок согласно SEQ ID NO: 13) с использованием биослойной интерферометрии на ForteBio Octet HTX (ForteBio). Биосенсоры захвата Fc человека (ForteBio, каталожный номер 18-5060) нагружали hlgG (1 мкг/мл) в течение 600 с. После измерения исходного уровня (200 с.) ассоциацию (1000 с.) и диссоциацию (2000 с.) CD3E27-GSKa определяли в диапазоне концентрации CD3E27-GSKa 27,11 мкг/мл - 0,04 мкг/мл (1000 нМ - 1,4 нМ) с трехкратным шагом разведения (разбавитель образцов, ForteBio, каталожный номер 18-5028). Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу CD3E27-GSKa, исходя из аминокислотной последовательности, то есть 27,11 кДа. Эксперименты проводили при встряхивании со скоростью 1000 об/мин и при 30°C. Каждое антитело тестировали по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных ForteBio версии 8.1 с использованием модели 1:1 и полного глобального соответствия с временем ассоциации 1000 с. и временем диссоциации 100 с. Следы данных корректировали путем вычитания эталонной кривой (антитело на биосенсоре, измерение только с разбавителем образцов), ось Y выравнивали по последним 10 с. исходного уровня, и применяли коррекцию между шагами, а также фильтрацию Савицкого-Голая. Следы данных с откликом <0,05 нм исключали из анализа.

В таблице 10 показаны константа скорости ассоциации  $k_a$  (1/Мс), константа скорости диссоциации  $k_d$  (1/с) и равновесная константа диссоциации  $K_D$  (М) для рекомбинантной CD3ε, определенные с помощью биослойной интерферометрии. IgG1-huCD3-FEAL продемонстрировало относительно высокую ( $K_D$ : 15 нМ) аффинность связывания с рекомбинантной CD3ε по сравнению с IgG1-huCD3-H101G-FEAL ( $K_D$ : 683 нМ).

Таблица 10: Аффинность связывания моноспецифического бивалентного антитела к CD3 с рекомбинантной CD3ε, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии

Антитело	Скорость ассоциации $k_a$ (1/Мс)	Скорость диссоциации $k_d$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
IgG1-huCD3-FEAL	2,7E+05	4,0E-03	15

IgG1-huCD3-H101G-FEAL	3,0E+04	2,0E-02	683
-----------------------	---------	---------	-----

Пример 5. Перекрестная блокировка антител к В7Н4, определенная с помощью биослойной интерферометрии

Анализ перекрестной блокировки антител (биннинг эпитопов) в классическом сэндвич-формате проводили с помощью BLI на приборе Octet HTX (FortéBio). Первый эксперимент по перекрестному блокированию с IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C4-FEAR проводили при встряхивании со скоростью 1000 об/мин и при 30°C.

Биосенсоры Amine Reactive 2-го поколения (AR2G) (FortéBio, каталожный номер 18-5092) активировали в течение 300 с. раствором 20 mM EDC (гидрохлорид *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида) (Sigma-Aldrich, каталожный номер 03449) и 10 mM s-NHS (натриевая соль *N*-гидроксисульфосукцинимид) (Sigma-Aldrich, каталожный номер 56485). Активированные сенсоры AR2G нагружали 20 мкг/мл первого антитела в 10 mM ацетата натрия с pH 6,0 (FortéBio, каталожный номер 18-1070) в течение 600 с. и гасили 1 M этаноламина с pH 8,5 (FortéBio каталожный номер 18-1071) в течение 300 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образцов (50 с.; FortéBio, каталожный номер 18-1048) биосенсоры AR2G, содержащие иммобилизованные антитела, нагружали в течение 300 с. человеческим В7Н4 (100 нМ или 2,68 мкг/мл, разведен в разбавителе образцов; Sino Biological, каталожный номер 10738-H08H). Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу человеческого В7Н4, исходя из аминокислотной последовательности (26,8 кДа). Определяли ассоциацию (300 с.) второго антитела (10 мкг/мл в разбавителе образцов). Сенсоры регенерировали воздействием 10 mM глицинового (Riedel-de Haën, каталожный номер 15527) буфера с pH 2,5 в течение 5 с. с последующей нейтрализацией в разбавителе образцов в течение 5 с.; обе стадии повторяли дважды. Затем сенсоры, содержащие иммобилизованное первое антитело, использовали снова, начиная со стадии исходного уровня.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных HT версии 10.0.17 (FortéBio). Следы данных корректировали путем вычитания эталонной кривой (разбавитель образцов вместо второго антитела), для того чтобы внести поправку на диссоциацию В7Н4 от иммобилизованного первого антитела. Ось Y выравнивали по началу стадии ассоциации, и применяли фильтрацию Савицкого-Голая. Скорректированные отклики на ассоциации вторых антител наносили на график в

матричном формате. Как правило, при откликах  $>0,05$  нм антитела считали не перекрестно блокирующими, тогда как при откликах  $<0,05$  нм пары антител считали блокирующими.

Эксперимент по перекрестному блокированию повторяли, чтобы также включить IgG1-B7H4-C5-FEAR, и проводили, как описано выше, с небольшими изменениями. Эксперимент проводили при встряхивании со скоростью 1000 об/мин и при 22°C. Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных версии 12.0.1.8 (ForteBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных HT версии 12.0.1.55 (ForteBio). Как правило, при откликах  $>0,1$  нм антитела считали не перекрестно блокирующими, тогда как при откликах  $<0,1$  нм пары антител считали блокирующими.

Первоначальные эксперименты по перекрестному блокированию проводили для антител IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR и IgG1-B7H4-C2-FEAR. Результаты обобщены в таблице 11. Была проведена вторая серия экспериментов по перекрестному блокированию, включающая также IgG1-B7H4-C5-FEAR. Эти результаты обобщены в таблице 12. В первом столбце показаны иммобилизованные антитела; в первой строке показаны антитела в растворе (обозначенные выше как «вторые антитела»). Показаны скорректированные отклики на ассоциацию антител в растворе. Перекрестная блокировка антител обозначена темно-серым цветом, а неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон), что указывает на то, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR перекрестно блокируют друг друга, но не IgG1-B7H4-C4-FEAR и IgG1-B7H4-C2-FEAR, и наоборот.

Таблица 11: Первый эксперимент по перекрестному блокированию антител с использованием биослойной интерферометрии.

В первом столбце показаны иммобилизованные антитела, а в первой строке показаны антитела в растворе. Показаны скорректированные отклики на ассоциацию антител в растворе. Перекрестная блокировка антител обозначена темно-серым цветом, неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон).

<b>Перекрестная блокировка антител</b>	IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-0,01	0,00	0,80	0,56
IgG1-B7H4-C3-FEAR	-0,02	-0,01	0,97	0,53
IgG1-B7H4-C4-FEAR	0,82	0,56	-0,02	-0,01
IgG1-B7H4-C2-FEAR	0,74	0,54	0,00	0,00

Таблица 12: Второй эксперимент по перекрестному блокированию антител с использованием биослойной интерферометрии.

В первом столбце показаны иммобилизованные антитела, а в первой строке показаны антитела в растворе. Показаны скорректированные отклики на ассоциацию антител в растворе. Перекрестная блокировка антител обозначена темно-серым цветом, неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон).

Перекрестная блокировка антител	IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C5-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	0	0,01	0,38	0,42	0,43
IgG1-B7H4-C3-FEAR	0,01	0	0,44	0,57	0,61
IgG1-B7H4-C2-FEAR	0,28	0,25	0,01	0,01	0,02
IgG1-B7H4-C4-FEAR	0,5	0,39	0	-0,01	0
IgG1-B7H4-C5-FEAR	0,67	0,57	-0,03	-0,03	-0,01

#### **Пример 6. Получение биспецифических антител путем 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плечами**

Биспецифические антитела получали *in vitro* с использованием технологии платформы DuoBody®, то есть 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плечами, как описано в документах WO2011147986, WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab) и Labrijn et al. (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962- 973). Чтобы обеспечить получение биспецифических антител с помощью этого способа, были созданы молекулы IgG1, несущие специфические точечные мутации в домене CH3: в одном родительском антителе IgG1 мутация F405L (то есть в антителе к CD3 согласно настоящей заявке), в другом родительском антителе IgG1 мутация K409R (то есть в антителе к B7H4 или в контрольном специфичном к gp120 ВИЧ-1 антителе согласно настоящей заявке). Помимо этих мутаций, родительские антитела IgG1 содержали замены L234F, L235E, D265A (FEA).

Для получения биспецифических антител два родительских антитела смешивали в равных массовых количествах в буфере PBS (Phosphate Buffered Saline, фосфатно-солевой буфер; 8,7 мМ  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 1,8 мМ  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 163,9 мМ  $\text{Na}^+$ , 140,3 мМ  $\text{Cl}^-$ , pH 7,4). Добавляли 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЕА) до конечной концентрации 75 мМ, и реакционную смесь инкубировали при 31°C в течение 5 ч. 2-МЕА удаляли диализом в буфер PBS с использованием кассет Slide-A-Lyzer с молекулярной массой отсечки 10 кДа (Thermo Fisher

Scientific) в соответствии с протоколом производителя, для того чтобы обеспечить повторное окисление межцепочечных дисульфидных связей и образование интактных биспецифических антител.

В примерах использовали следующие антитела:

*Антитела к B7H4*

IgG1-B7H4-C1-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 33).

IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 33).

IgG1-B7H4-C2-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 47).

IgG1-B7H4-C3-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 40).

IgG1-B7H4-C4-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 54).

IgG1-B7H4-C5-FEAR (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 69).

Отметка IgG1 указывает на то, что были созданы полноразмерные антитела изотипа IgG1, а отметка FEAR указывает на то, что константные области тяжелой цепи содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и K409R и константные области легкой цепи относятся к типу каппа (SEQ ID NO: 61 и 63, соответственно).

*Антитела к CD3*

IgG1-huCD3-FEAL (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 22).

IgG1-huCD3-H101G-FEAL (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 22).

Отметка IgG1 указывает на то, что были созданы полноразмерные антитела изотипа IgG1, а отметка FEAL указывает на то, что константные области тяжелой цепи содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и F405L и константные области легкой цепи относятся к типу лямбда (SEQ ID NO: 60 и 64, соответственно).

*Контрольные антитела*

IgG1-b12-K409R (содержащее последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15).

Отметка IgG1 указывает на то, что были созданы полноразмерные антитела изотипа IgG1, а отметка K409R указывает на то, что константные области тяжелой цепи содержат

аминокислотную замену K409R и константные области легкой цепи относятся к типу каппа (SEQ ID NO: 62 и 63, соответственно).

*Биспецифические антитела*

Антитела к CD3 и B7H4, описанные выше, объединяли для получения биспецифического антитела, содержащего одну антигенсвязывающую область, способную связывать человеческий CD3, и другую антигенсвязывающую область, способную связывать B7H4, что дает биспецифическое антитело изотипа IgG1, которое отмечено как bsIgG1.

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (для плеча b12, содержащего последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15)

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR

**Пример 7. Определение домена B7H4 и функционального эпитопа, участвующего в связывании, с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 и библиотеки аланинового сканирования B7H4**

*Картирование домена с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 с использованием анализа конечной точки*

Специфичность к домену B7H4 антител к B7H4 определяли с использованием панели клеток, трансфицированных для экспрессии человеческого B7H4, человеческого B7H3 (структурно сопоставимого белка с достаточным отличием аминокислотной последовательности во внеклеточном домене) или двух различных человеческих химерных молекул B7H4-B7H3. Получали экспрессионные конструкции, кодирующие человеческий B7H4, человеческий B7H3 (номер доступа в Uniprot Q5ZPR3-1; SEQ ID NO: 9), или химерную молекулу, содержащую IgV-домен B7H3 и IgC-домен B7H4 (B7H3-IgV/B7H4-IgC; SEQ ID NO: 11), или химерную молекулу, содержащую IgV-домен B7H4 и IgC-домен

B7H3 (B7H4-IgV/B7H3-IgC; SEQ ID NO: 10). Клетки НЕК временно трансфицировали для экспрессии этих конструкций.

Клетки ( $3 \times 10^4$  клеток на лунку) инкубировали в полистироловых 96-луночных планшетах с круглым дном (Greiner bio-one, каталожный номер 650101) с серийными разведениями антител (диапазон от 0,0046 до 10 мкг/мл с 3-кратным шагом разведения) в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер для FACS) при 4°C в течение 30 мин. После двукратного промывания в буфере для FACS клетки инкубировали со вторичным антителом при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с R-фикоэритрином (PE) козье антитело к человеческому F(ab')<sub>2</sub> IgG (1:500 в буфере для окрашивания; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, каталожный номер 109-116-098). Затем клетки дважды промывали в буфере для FACS, ресуспендировали в 20 мкл буфера для FACS и анализировали с помощью iQue Screener (Intellicyt Corporation, США). Связывание bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR в концентрации 10 мкг/мл определяли как % средней интенсивности флуоресценции (MFI) при связывании 10 мкг/мл:

- IgG1-B7H3-BRCA84D (B7H3-специфическое антитело IgG1, полученное, как описано выше, с последовательностями CDR, как описано для антитела BRCA84D в документе WO2011109400) с экспрессирующими B7H3 клетками,
- bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR с экспрессирующими B7H3-IgV/B7H4-IgC клетками,
- bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR с экспрессирующими B7H4-IgV/B7H3-IgC клетками,
- и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR с экспрессирующими B7H4 клетками.

На фигуре 1 показано, что IgC-домен B7H4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR, как IgC, так и IgV-домены B7H4 участвуют в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR, и по меньшей мере IgV-домен B7H4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR. В отношении антитела C2, из которого использовали вариабельные домены для создания bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR, было описано, что оно связывается с IgV-доменом; данные на фигуре 1 указывает на то, что IgC-домен также участвует в связывании (WO2014159835 и Leong et al 2015, Mol. Pharmaceutics 12, 1717–1729).

Картирование домена с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 с использованием анализа полных кривых доза-эффект

Для более детального изучения специфичности антител к В7Н4 к домену В7Н4 путем анализа полных кривых доза-эффект были проведены дальнейшие эксперименты. В этих экспериментах также определяли специфичность bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR к домену. Связывание серийных разведений (от 0,014 до 30 мкг/мл с 3-кратным шагом разведения) bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR с клетками НЕК, временно трансфицированными для экспрессии человеческого В7Н4 или химерных молекул В7Н4-В7Н3 В7Н3-IgV/В7Н4-IgC или В7Н4-IgV/В7Н3-IgC, определяли, как описано выше. На фигуре 2 показаны кривые доза-эффект, показывающие, что IgC-домен В7Н4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, что соответствует результатам экспериментов с библиотекой аланинового сканирования. Кроме того, IgV-домен участвует в связывании bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR, тогда как и IgC, и IgV-домены, по-видимому, участвуют в связывании bsIgG1-huCD3-H101GFEALxB7Н4-C3-FEAR.

Определение вклада аминокислотных остатков В7Н4 в связывание антител к В7Н4 с использованием библиотеки аланинового сканирования В7Н4

Конструирование библиотеки

Была синтезирована (GeneArt) библиотека с отдельными остатками аланина в человеческом В7Н4 (Uniprot Q7Z7D3-1), в которой все аминокислотные остатки во внеклеточном домене человеческого В7Н4 были по отдельности мутированы в аланины, за исключением положений, содержащих аланины или цистеины. Цистеины не подвергали мутациям, чтобы свести к минимуму вероятность структурного разрушения антигена. Библиотеку клонировали в вектор экспрессии рМАС, содержащий кассету экспрессии CMV/TK-polyA, ген устойчивости к Amp и точку начала репликации рBR322.

Получение и скрининг библиотеки

Антитела С1-N52S, С2 и С3 получали в виде рекомбинантных моновалентных антител, как описано в документе WO2007059782, с меткой mNeonGreen. В7Н4 дикого типа и аланиновых мутантов экспрессировали по отдельности в клетках FreeStyle НЕК293 в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific). Через один день после трансфекции клетки собирали. Приблизительно 50000 клеток инкубировали с 20 мкл представляющего интерес антитела, меченного mNeonGreen. Клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем добавляли 150 мкл буфера для FACS, и клетки дважды промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в 30 мкл свежего

буфера для FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием iQue Screener (Intellicyt Corporation, США).

Весь эксперимент проводили 2 раза в двух повторностях.

#### Анализ данных

Для каждого образца среднее связывание антитела на клетку определяли как среднее геометрическое интенсивности флуоресценции (gMFI) для негейтированной популяции клеток. На gMFI влияет аффинность антитела к мутанту В7Н4 и уровень экспрессии мутанта В7Н4 на клетку. Поскольку конкретные аланиновые мутации могут влиять на уровень поверхностной экспрессии мутанта В7Н4, и для корректировки различий в экспрессии для каждого мутанта В7Н4 в целом, данные нормализовали по интенсивности связывания не перекрестно блокирующего В7Н4-специфического эталонного антитела с использованием следующего уравнения:

$$\text{Нормализованное gMFI}_{\text{aa position}} = \frac{\text{gMFI}_{\text{Test Ab}}}{\text{gMFI}_{\text{Reference Ab}}},$$

где С2 использовали в качестве эталонного антитела для С1-N52S и С3, и С1-N52S использовали в качестве эталонного антитела для С2, и где «aa position» относится или к конкретному ala-мутанту В7Н4, или к В7Н4 дикого типа (wt).

Чтобы выразить потерю или усиление связывания антител по линейной шкале кратности изменения, использовали следующую формулу:

$$\text{Кратность изменения} = \text{Log}_{10} \left( \frac{\text{Нормализованное gMFI}_{\text{ala mutant}}}{\text{Нормализованное gMFI}_{\text{wt}}} \right).$$

Усиление связывания в большинстве случаев будет вызвано потерей связывания эталонного антитела с конкретными ala-мутантами.

При этих расчетах положения аминокислот, для которых при замене аминокислоты на аланин нет потери или усиления связывания конкретным антителом, дадут результат «0», усиление связывания приведет к результату «>0», а потеря связывания приведет к результату «<0». Чтобы внести поправку на различия образцов, только аминокислотные остатки В7Н4, для которых кратность изменения связывания была ниже, чем средняя кратность изменения  $-1,5 \times \text{CO}$ , где CO представляет собой стандартное отклонение рассчитанных значений кратности изменения по четырем независимым экспериментам для конкретного тестируемого антитела, считали «мутантами с потерей связывания».

В случае, если gMFI эталонного антитела для конкретного мутанта В7Н4 было ниже, чем среднее gMFI  $-2,5 \times \text{CO}$  среднего gMFI<sub>Control Ab</sub>, данные исключали из анализа (так как для этих мутантов В7Н4 уровни экспрессии считали недостаточными).

На фигуре 3 показана кратность изменения связывания антител к В7Н4 с вариантами В7Н4 с ala-мутациями в ECD, с отмеченными аминокислотными остатками, у которых

кратность изменения связывания была ниже средней кратности изменения  $-1,5 \times CO$ . Кратность изменения указана на фигуре 3 как Z-показатель. Результаты показывают, что:

- связывание антитела C1-N52S по меньшей мере зависит от а. к. S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245, которые находятся в IgC-домене человеческого B7H4,
- связывание антитела C2 по меньшей мере зависит от а. к. R98, G99, R116, K118, N119 и D124, которые находятся в IgV человеческого B7H4, и
- связывание антитела C3 по меньшей мере зависит от а. к. N156, E164, V217 и R248, которые находятся в IgC-домене человеческого B7H4, и
- антитела C1-N52S, C2 и C3 распознают различные функциональные эпитопы на B7H4.

#### **Пример 8. Связывание моноспецифических антител к B7H4 и биспецифических антител к CD3×B7H4 с B7H4 различных видов**

Для начала, связывание биспецифических антител к CD3×B7H4 и моноспецифических антител к B7H4 с клетками HEK-293F, временно трансфицированными B7H4 человека или B7H4 яванского макака (*Macaca fascicularis*), анализировали с помощью проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки HEK-293F использовали в качестве отрицательного контроля; было (также) подтверждено, что эти клетки не экспрессируют CD3.

Клетки ( $3 \times 10^4$  клеток на лунку) инкубировали в полистироловых 96-луночных планшетах с круглым дном (Greiner bio-one, каталожный номер 650180) с серийными разведениями антител (в диапазоне от 0,000458 до 30 мкг/мл с 4-кратным шагом разведения) в 100 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер для окрашивания) при 4°C в течение 30 мин. Эксперименты проводили в двух технических повторностях. После двукратного промывания в буфере для окрашивания клетки инкубировали в 50 мкл вторичного антитела при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с R-фикоэритрином (PE) козье антитело к человеческому F(ab')<sub>2</sub> IgG (1:500 в буфере для FACS; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, каталожный номер 109-116-098). Клетки дважды промывали в буфере для окрашивания, ресуспендировали в 30 мкл буфера для FACS, содержащего Topro-3 (разведение 1:10000) и анализировали с помощью iQue Screener (Intellicyt Corporation, США). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость доза-эффект с переменным наклоном) с использованием

программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

На фигуре 4 показано, что как IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, так и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR связываются с клетками, экспрессирующими B7H4 человека или B7H4 яванского макака.

Затем определяли связывание с клетками HEK-293F, временно трансфицированными B7H4 собаки, кролика, крысы, мыши или свиньи, как описано выше. На фигуре 5 показано, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR связываются с B7H4 собаки, кролика, крысы и мыши в различной степени; для каждого из них кажущаяся аффинность (EC50) bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR была ниже, чем аффинность IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR не было способно связываться с B7H4 свиньи, тогда как IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR связывалось слабо и только при самых высоких протестированных концентрациях антитела.

Значения EC50 для связывания bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR с B7H4 человека и яванского макака находились в аналогичном диапазоне.

Аналогичные исследования проводили для сравнения связывания IgG1-B7H4-C1-052S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR с B7H4 различных видов (человека, яванского макака, мыши, крысы, кролика, собаки и свиньи). На фигуре 6 показано, что связывание с клетками HEK, трансфицированными B7H4 человека и яванского макака, было сходным для протестированных антител. Аналогичные результаты были получены с клетками, экспрессирующими B7H4 кролика и собаки. Однако связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR с B7H4 мыши оказалось ниже по сравнению со связыванием IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR, что соответствует результатам примера 3. Кроме того, связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и IgG1-B7H4-C3-FEAR с B7H4 крысы оказалось ниже по сравнению с IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR. Кроме того, хотя IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR связывались с B7H4 свиньи, связывание IgG1-B7H4-C1-052S-FEAR было очень слабым и проявлялось только при самой высокой протестированной концентрации антитела. Связывание IgG1-B7H4-C3-FEAR с B7H4 свиньи не было обнаружено.

**Пример 9. Связывание моноспецифических антител к В7Н4 и биспецифических антител к CD3×В7Н4 с линиями экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток**

Определяли связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, и/или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, и/или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с линиями экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы; ATCC, каталожный № HTB-22), MDA-MB-468 (аденокарцинома молочной железы; ATCC, каталожный номер HTB-132) и SK-BR3 (аденокарцинома молочной железы; ATCC, каталожный № HTB-30), и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с линиями экспрессирующих В7Н4 человеческих опухолевых клеток NIH-OVCAR-3 (аденокарцинома яичников; ATCC, каталожный номер HTB-161) или HCC1954 (карцинома протоков молочной железы; ATCC, каталожный номер CRL-2338). Кроме того, определяли связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C5-FEAR и/или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR с клетками MDA-MB-468 и HCC1954. Клеточные линии солидных опухолей обычно не экспрессируют CD3. В качестве отрицательного контроля использовали линию опухолевых клеток HeLa, которая не демонстрировала обнаруживаемой экспрессии В7Н4 (аденокарцинома шейки матки; ATCC, каталожный номер CCL-2). Связывание анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано выше.

На фигуре 7 показано, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR демонстрировали сопоставимое дозозависимое связывание с клетками MCF-7 и MDA-MB-468 с сопоставимыми максимальными уровнями связывания.

На фигуре 8 показано дозозависимое связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с клетками NIH-OVCAR-3 и HCC1954 и отсутствие обнаруживаемого связывания с неэкспрессирующей В7Н4 клеточной линией HeLa.

Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с экспрессирующими В7Н4 опухолевыми клетками сравнивали с использованием клеток MDA-MB-486 и SK-BR3. На фигуре 9 показано, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR демонстрировали сопоставимое дозозависимое связывание с этими клетками с сопоставимыми максимальными уровнями связывания.

На фигуре 10 показано дозозависимое связывание антител C1-N52S, C2, C3, C4 и C5 B7H4 в формате гомодимера или биспецифического антитела с клетками MDA-MB-468 и HCC1954. Антитела на основе C4 и C5 демонстрировали наиболее эффективное связывание, антитела на основе C1-N52S и C2 демонстрировали промежуточную эффективность связывания, а антитела на основе C3 демонстрировали наименьшую эффективность связывания. Максимальное связывание было сопоставимым для антител на основе C1-N52S, C2, C4 и C5, но ниже для антител на основе C3.

**Пример 10. Связывание антитела к B7H4 с первичными опухолевыми клетками**

Первичные опухолевые клетки от пациента с раком яичников получали от Discovery Life Sciences (Huntsville, AL, США; ID пациента 110045042). Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR с опухолевыми клетками оценивали с помощью проточной цитометрии: клетки высевали по  $2 \times 10^4$  клеток на лунку в полистироловые 96-луночные планшеты с круглым дном (Greiner bio-one, каталожный номер 650180), центрифугировали и инкубировали с 50 мкл Fixable Viability Stain FVS-BV510 (BD Biosciences, каталожный номер 564406), разведенного 1:1000 в PBS, при 4°C в течение 30 мин. После промывания в буфере для окрашивания клетки инкубировали с меченым FITC IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и панелью специфических к CD3 (меченное EF450; eBioscience, каталожный номер 48-0037-42), CD45 (меченное BV786; Biolegend, каталожный номер 304048), CD14 (меченное PE-Cy7; BD Biosciences, каталожный номер 557742), CD86 (меченное PerCP-Cy5.5; Biolegend, каталожный номер 305420), CD163 (меченное APC-Cy7; Biolegend, каталожный номер 333622) и EpCAM (меченное AF700; R&D Systems, каталожный номер FAB9601N) антител при 4°C в течение 30 мин. После промывания клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Отдельные клетки подвергали гейтированию на основе рассеяния FSC/SSC, и живые клетки идентифицировали путем исключения FVS-BV510-положительных клеток. Опухолевые клетки идентифицировали как EpCAM-положительные клетки.

Проточный цитометрический анализ показал, что IgG1-B7H4-N52S-FEAR связывается с EpCAM-положительными живыми опухолевыми клетками, но не с моноцитами или Т-клетками в суспензии диссоциированных опухолевых клеток образца рака яичников.

**Пример 11. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами к CD3×B7H4 с использованием очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях эффектор-мишень**

Для определения эффективности опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток в присутствии биспецифических антител bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR проводили анализ цитотоксичности *in vitro* с использованием B7H4-положительных линий опухолевых клеток в качестве клеток-мишеней и очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток с различным соотношением эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T).

Т-клетки получали из светлых слоев здорового донора-человека (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и выделяли с использованием коктейля для обогащения человеческими Т-клетками RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Франция, каталожный номер 15061) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки SK-BR3 (16000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Greiner-bio-one, Нидерланды, каталожный номер 655180) и оставляли для адгезии на 4 часа при 37°C. Т-клетки добавляли к опухолевым клеткам при соотношении эффектора к мишени (E:T) 2:1, 4:1 или 8:1. Добавляли серийные разведения bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (конечная концентрация в диапазоне от 10000 до 0,0128 нг/мл; 5-кратные разведения), и планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Планшеты промывали PBS 3 раза, и клетки инкубировали с 150 мкл на лунку 10% раствора alamarBlue(r) (Invitrogen, каталожный номер DAL1100) в течение 4 часов при 37°C. В качестве положительного контроля цитотоксичности клетки инкубировали с 16 мкг/мл оксида фениларсина (PAO; Sigma-Aldrich, каталожный номер P3075; растворен в диметилсульфоксиде [DMSO; Sigma-Adrich, каталожный номер D2438]). Флуоресценцию AlamarBlue как меру метаболической активности культур опухолевых клеток и, следовательно, жизнеспособных опухолевых клеток измеряли на 615 нм (OD615) на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer). Поглощение обработанных PAO образцов опухолевых клеток принимали за 0% жизнеспособности, а поглощение необработанных образцов опухолевых клеток принимали за 100% жизнеспособности. «Процент жизнеспособных клеток» рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \left( \frac{[\text{поглощение образца} - \text{поглощение обработанных PAO клеток-мишеней}]}{[\text{поглощение необработанных клеток-мишеней} - \text{поглощение обработанных PAO клеток-мишеней}]} \right) \times 100.$$

Кривые доза-эффект и значения IC50 получали с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная зависимость доза-эффект с переменным наклоном)

с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

На фигуре 11 показано, что опосредованную Т-клетками цитотоксичность наблюдали при всех соотношениях Е:Т, причем максимальный киллинг опухолевых клеток (менее 10% жизнеспособных опухолевых клеток) наблюдали при соотношении Е:Т 8:1.

**Пример 12. Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных линиях опухолевых клеток биспецифическими антителами к CD3×B7H4 и корреляция с уровнем экспрессии B7H4**

Опосредованное Т-клетками уничтожение биспецифическими антителами bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR различных экспрессирующих B7H4 линий опухолевых клеток определяли с помощью анализа цитотоксичности *in vitro*, как описано выше, с использованием соотношения Е:Т 8:1. Использовали следующие клеточные линии: MCF-7, MDA-MB-486, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650. После каждой инкубации 150 мкл супернатантов, содержащих Т-клетки, переносили в 96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном (CellStar, каталожный номер 650180) перед промыванием и инкубацией с alamarBlue (для определения активации Т-клеток и высвобождения цитокинов, как описано ниже).

Для этих линий опухолевых клеток количественно определяли экспрессию B7H4 с помощью количественной проточной цитометрии (Human IgG calibrator, BioCytex) в соответствии с инструкциями производителя, с использованием bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR для детектирования B7H4.

На фигуре 12 показано, что как bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, так и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR индуцировали дозозависимую опосредованную Т-клетками цитотоксичность в клетках MCF-7, MDA-MB-486, SK-BR3, NIH-OVCAR-3 и HCC1954 *in vitro*. Хотя максимальная цитотоксическая активность (<10% жизнеспособных опухолевых клеток) была достигнута для обоих вариантов bsAb, это произошло при более низких концентрациях для bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (таблица 13).

Никакой значимой связи между лизисом опухолевых клеток и уровнем экспрессии B7H4 (фигура 13А) не наблюдали ни для bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, ни для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (фигура 13В). На фигуре 13В показана IC50 опосредованного Т-клетками уничтожения при использовании Т-клеток, полученных от 4-6 доноров, в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR для каждой клеточной линии, причем

клеточные линии расположены от самого низкого до самого высокого уровня экспрессии В7Н4. Это означает, что опосредованный Т-клетками киллинг может происходить в широком диапазоне уровней экспрессии В7Н4.

В таблице 13 обобщены результаты по панели из 5 клеточных линий и от 4 доноров.

Таблица 13. Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных линиях опухолевых клеток биспецифическими антителами к CD3×В7Н4

Диапазон IC50 (4 донора для каждой клеточной линии) (мкг/мл)				
клеточная линия	CD3-H101GXB7H4		CD3×B7H4	
	самая низкая	самая высокая	самая низкая	самая высокая
MCF7	0,55	1,29	0,012	0,025
OVCAR3	0,09	1,629	0,003	0,012
NCI-H16650	1,67	5,07	н/о	н/о
MDA-MB-468	0,08	0,16	0,001	0,004
HCC1954	0,06	0,22	0,001	0,008
SK-BR3	0,09	0,22	0,002	0,016

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR также индуцировало дозозависимую опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении тестируемой клеточной линии NSCLC NCI-H1650.

**Пример 13. Индукция активации Т-клеток и продукции цитокинов *in vitro* биспецифическими антителами к CD3×В7Н4 в присутствии В7Н4-положительных опухолевых клеток**

Культуральные 96-луночные планшеты с U-образным дном, содержащие супернатанты, собранные во время экспериментов *in vitro* по опосредованной Т-клетками цитотоксичности, описанных в примере 12, центрифугировали (300×g) в течение 3 мин. при 4°C, после чего 75 мкл супернатанта переносили в новый планшет для измерения продукции цитокинов, и Т-клетки оставляли для оценки активации Т-клеток (описано ниже). Продукцию цитокинов анализировали с помощью мультиплексного анализа U-plex (MeSo Scale Discovery, США, каталожный номер K15049K) в соответствии с инструкциями производителя.

Т-клетки окрашивали на Т-клеточные маркеры CD3 (1:200; eBioscience, клон ОКТ3, конъюгированный с eFluor450), CD4 (1:50; eBioscience, клон ОКТ4, конъюгированный с APC-eFluor780), CD8 (1:100; Biolegend, клон RPA-T8, конъюгированный с AF700) и маркеры активации Т-клеток CD69 (1:50; BD Biosciences, клон АВ2439, конъюгированный

с APC), CD25 (1:50; eBioscience, клон BC96, конъюгированный с PE-Cy7) и CD279/PD1 (1:50; Biolegend, клон EH12,2H7, конъюгированный с BV605). Включали одиночные окрашенные образцы с гранулами Ultracom (5 мкл; Invitrogen, каталожный номер 01-2222-42), и использовали их для регулировки компенсации проточного цитометра. После 30 мин. инкубации при 4°C планшеты три раза промывали PBS/0,1% BSA/0,02% азидом (буфер для окрашивания). Клетки ресуспендировали в 120 мкл буфера для окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Данные обрабатывали с использованием FlowJo (BD Biosciences).

Кривые доза-эффект, значения EC50, EC90 и EC99 рассчитывали с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная зависимость доза-эффект с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

На фигуре 14A показана активация Т-клеток в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR для B7H4-положительных линий опухолевых клеток, как определено по экспрессии маркеров активации CD69 на CD8+ Т-клетках (определенной с помощью проточной цитометрии). На фигуре 14B показана EC50 активации Т-клеток при использовании Т-клеток, полученных от 3-4 доноров, для каждой из линий опухолевых клеток.

В целом, подмножество (приблизительно 20-50% при самой высокой концентрации антител) CD8+ Т-клеток становились активированными в присутствии или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR. Активация Т-клеток, индуцированная bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, обычно происходит при более высоких концентрациях, чем индуцированная bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (фигура 14A). EC50 активации Т-клеток для обоих биспецифических антител варьировала в зависимости от используемой клеточной линии-мишени и от доноров (фигура 14B).

Продукцию цитокинов оценивали в супернатантах культур опухолевых клеток-Т-клеток с помощью мультиплексного ELISA Mesoscale Discovery U-plex. Из 10 цитокинов, проанализированных на панели клеточных линий с использованием Т-клеток от 4 доноров, значительное повышение уровней цитокинов в первую очередь наблюдали для IFN-гамма и IL-8 (>2000 пг/мл). IL-4, IL-6 и IL-13 модулировались на гораздо более низких уровнях (<500 пг/мл), тогда как уровни IL-1-бета, IL-2, IL-10, IL-12p70 и TNF-альфа были в целом ниже 50 пг/мл. Поскольку изменения IFN-гамма были достоверно и последовательно обнаружены и IFN-гамма является одним из основных цитокинов, уровень которых

повышен в сыворотке пациентов с синдромом высвобождения цитокинов, представлены данные для этого цитокина.

На фигуре 15 показаны уровни IFN-гамма в супернатанте совместных культур Т-клеток и опухолевых клеток при концентрациях антител, которые индуцировали опосредованную Т-клетками цитотоксичность в 50%, 90% и 99% опухолевых клеток (EC50, EC90, EC99, соответственно) в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, при использовании Т-клеток от по меньшей мере 3 доноров, проанализированные по клеточным линиям. Уровни продукции цитокинов изменялись по донорам и по целевым линиям опухолевых клеток. Тем не менее, при концентрациях антител, которые индуцировали тот же уровень (%) киллинга опухолевых клеток, в целом наблюдали более низкие уровни продукции цитокинов после воздействия на совместные культуры Т-клеток и опухолевых клеток bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению с уровнями после воздействия bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR. Таким образом, при том же уровне киллинга опухолевых клеток инкубация с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR приводила к более низкой продукции цитокинов, чем с bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

#### **Пример 14. Доклинические исследования безопасности биспецифических антител к CD3×B7H4 на яванских макаках**

Доклинический профиль безопасности bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR оценивали на отличных от человека вида приматах (яванских макаках, *Macaca fascicularis*, происходящих из Маврикия) в Citoxlab, Франция. Яванские макаки были сочтены единственным видом, подходящим для доклинических исследований безопасности на основании видовой специфичности плеч CD3 в bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и, кроме того, из-за сходного связывания плеча B7H4 с B7H4 человека и яванского макака и других фармакологических результатов. Эти исследования проводились в соответствии с правилами охраны здоровья животных (директива Совета № 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и французский декрет № 2013-118 от 1 февраля 2013 г. о защите животных, используемых в научных целях).

Целью исследований было определение потенциальной токсичности и токсикокинетики биспецифических антител к CD3×B7H4. Здесь описаны только результаты токсикокинетики и определения уровня цитокинов в плазме.

В двух отдельных исследованиях животным вводили однократную дозу 0,1, 1, 3 или 10 мг/кг bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-

FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (одна самка животного на дозу) путем внутривенной (в/в) инфузии. День инфузии отмечали как день 1 исследования. Образцы крови брали дважды перед введением дозы и через и через 0,5 ч., 2 ч., 4 ч., 12 ч., 24 ч. и 48 ч. после введения дозы для оценки токсикокинетического профиля и уровней цитокинов в плазме и дополнительно через 168, 336 и 504 часов после введения дозы для токсикокинетики.

#### *Уровни цитокинов*

Образцы плазмы анализировали на уровни цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-12p70, IL-15 и CCL2/MCP1) с использованием технологии Luminex xMAP.

Введение bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR яванским макакам вызывало лишь незначительные изменения в уровнях цитокинов в плазме, которые посчитали не связанными с тестируемым соединением, тогда как введение bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR приводило к дозозависимому повышению уровней IL-6 и MCP-1, как показано на фигуре 16.

Более низкие уровни цитокинов, вырабатываемые после получения биспецифического BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению с антителом BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, могут давать преимущество в клинических условиях.

#### *Токсикокинетика*

Концентрации биспецифических антител к CD3 $\times$ B7H4 в плазме определяли с использованием общего способа IgG РК ECLIA. Токсикокинетические параметры оценивали с использованием фармакокинетического программного обеспечения Certara Phoenix WinNonlin версии 8.1 с использованием некомпартментного подхода, соответствующего пути введения в виде внутривенной инфузионной инъекции. На фигуре 17 показано, что токсикокинетические профили обоих биспецифических антител к CD3 $\times$ B7H4 были в значительной степени сопоставимы вплоть до 7 дней после введения дозы, причем они оба демонстрируют связанную с дозой экспозицию в плазме.

Проводили фармакокинетический модельный эксперимент, чтобы оценить, будет ли прогнозируемый диапазон клинических доз, требуемый вариантом BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с более низкой аффинностью к CD3, неприемлемо высоким. Использовали ФК-модель, основанную на наблюдениях за яванским макаком. Получили диапазон клинических доз, который, как ожидается, приведет к средней недельной экспозиции в плазме, равной EC50–EC90 для опосредованного Т-клетками уничтожения клеток, как наблюдали *in vitro*. Полученный диапазон доз сочли приемлемым, и этот аспект не дал оснований априори отдать предпочтение одному типу биспецифических антител

перед другим (BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению с BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR).

### **Пример 15. Экспрессия В7Н4 при различных признаках рака человека**

Уровни иРНК В7Н4 извлекали из базы данных Omicsoft TCGA и визуализировали с использованием программного обеспечения Oncoland (Qiagen, США).

На фигуре 18 показаны уровни экспрессии иРНК В7Н4 в ряде первичных солидных опухолей, упорядоченные в соответствии с медианой экспрессии. Экспрессия иРНК была обнаружена при широком диапазоне признаков рака и различалась для всех признаков, причем самая высокая медианная экспрессия была обнаружена при карциносаркоме матки (UCS), уротелиальной карциноме мочевого пузыря (BLCA), аденокарциноме поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциноме легких (LUSC), инвазивной карциноме молочной железы (BRCA), карциноме эндометрия тела матки (UCEC), серозной цистаденокарциноме яичников (OV) и холангиокарциноме (CHOL).

Экспрессию белка В7Н4 при раке толстой кишки, легких (мелкоклеточный рак легких, SCLC (small cell lung cancer) и немелкоклеточный рак легких, NSCLC (non-small cell lung cancer)), желудка, поджелудочной железы, мочевого пузыря, шейки матки, головы и шеи, молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы, TNBC (triple-negative breast cancer)), яичников, пищевода, почек, предстательной железы и матки и при холангиокарциноме анализировали с помощью иммуногистохимии (immunohistochemistry, ИХ) на тканевых микрочипах (tissue microarray, ТМА; все закуплены у BioMax). Перед окрашиванием свежесрезы ТМА (5 мкм) депарафинировали и инкубировали с буфером для демаскировки с pH 9 (ДАКО, S2367; 30 мин. при 97°C, охлаждение 60 мин.). ИХ В7Н4 проводили с использованием коммерческого кроличьего моноклонального антитела против человеческого В7-Н4 (клон D1M8I, #14572, Cell Signaling Technologies) в оптимальном разведении (1:25; конечная концентрация 2,6 мкг/мл) в течение 30 мин. (RT) на платформе LabVision Autostainer. Затем срезы инкубировали с полимером IgG против антител кролика (Envision™ FLEX+ Rabbit (ДАКО, S2022)), промывали и инкубировали с хромогенной системой ДАКО Liquid DAB+ Substrate (ДАКО, K3468). Для обнаружения ядродержащих клеток использовали гематоксилин (ДАКО, S3301). Проводили ИХ цитокератина (для определения области интереса, ROI (region of interest), опухоли) со смесью мышиных антицитокератиновых антител (клоны AE1/AE3) на Ventana Benchmark с использованием детектирования на OptiView. Цитокератин визуализировали с помощью ДАВ, и ядра контрокрашивали гематоксилином с использованием реагентов Ventana по умолчанию. Окрашенные срезы ТМА оцифровывали при 20-кратном увеличении на

AxioScan (Zeiss). Первоначально проводили ручную оценку для определения средней интенсивности окрашивания В7Н4 (отрицательная-низкая-средняя-высокая) и процентной доли опухолевых ядер с >10% В7Н4-положительных опухолевых клеток.

Затем проводили автоматизированную оценку. ROI опухоли определяли с использованием цитокератиновой маски на срезах ТМА, соседних с окрашенными на В7Н4. Количественно определяли интенсивность окрашивания В7Н4 в ROI опухоли (отрицательная, слабая (1), умеренная (2) или сильная (3)), и определяли процентную долю В7Н4-положительных опухолевых клеток (диапазон 0-100%) с использованием программного обеспечения для анализа изображений HALO. Для каждого признака определяли процентную долю опухолевых ядер с >10% В7Н4-положительных опухолевых клеток.

В таблице 14 показана экспрессия белка В7Н4, определенная с помощью ИHC-анализа ТМА BioMax. В образцах рака толстой кишки, предстательной железы, почек и мелкоклеточного рака легких наблюдали экспрессию В7Н4 от отсутствующей до очень низкой. В образцах других признаков экспрессия В7Н4 была различной, причем увеличение экспрессии В7Н4 было обнаружено при раке желудка, раке поджелудочной железы, холангиокарциноме, раке пищевода, раке мочевого пузыря, немелкоклеточном раке легких (в частности, плоскоклеточном NSCLC), раке шейки матки, раке головы и шеи, раке молочной железы (трижды негативном раке молочной железы [TNBC] и не TNBC), раке яичников и раке матки.

Таблица 14. Экспрессия белка В7Н4, определенная с помощью ИHC-анализа ТМА BioMax. Н/о = не определено.

		Ручная оценка		Автоматизированная оценка
Признак (ТМА BioMax)		>10% В7Н4-положительных (любая интенсивность, по визуальной оценке)	Интенсивность окрашивания	>10% В7Н4-положительных (1+ и выше, по данным анализа цифровых изображений)
Рак толстой кишки (n=64)		0%	Отрицательная	
Рак легких	SCLC (n=60)	1%	Отрицательная-низкая	

NSCLC	AC (n=82)	17%	Низкая	н/о
	SQCC (n=95)	48%	Средняя	н/о
Рак желудка (n=90)		17%	Низкая	
Рак поджелудочной железы (n=60)		25%	Низкая	н/о
Холангиокарцинома (n=98)		31%	Низкая	16%
Рак мочевого пузыря (n=60)		43%	Низкая-средняя	25%
Рак шейки матки (n=60)		52%	Низкая-средняя	27%
Рак головы и шеи (n=92)		47%	Низкая-средняя	23%
Рак молочной железы	все (n=232)	78%	Средняя-высокая	72%
	TNBC (n= 35)	89%	Средняя-высокая	н/о
Рак яичников (n=74)		82%	Средняя-высокая	68%
Рак матки (n=73)		82%	Средняя-высокая	75%
Рак пищевода (n= 53)		36%	Низкая	н/о
Рак почек (n= 83)		9%	Отрицательная	н/о
Рак предстательной железы (n= 57)		1%	Отрицательная	н/о

**Пример 16. Термическая стабильность и коллоидная стабильность при различных значениях pH**

Получали различные составы с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (20 мг/мл) с различными значениями pH с использованием диапазона буферных средств (ацетат, глутамат, сукцинат, цитрат, гистидин, фосфат и трис), охватывающие диапазон pH от 4,0 до 8,0, как показано в таблице 15.

Таблица 15. Тестовые составы с различными значениями pH

Состав	Буфер	pH
1	20 мМ ацетата	4,0
2		4,5

3	20 мМ глутамата	4,5
4		5,0
5	20 мМ сукцината	5,0
6		5,5
7	20 мМ цитрата	5,5
8	20 мМ гистидина	5,5
9	20 мМ цитрата	6,0
10	20 мМ гистидина	6,0
11	20 мМ цитрата	6,5
12	20 мМ гистидина	6,5
13	20 мМ фосфата	6,5
14		7,0
15	20 мМ триса	7,5
16		8,0

Проводили дифференциальную сканирующую флуориметрию (differential scanning fluorimetry, DSF) для определения влияния каждой комбинации pH и буфера на термическую стабильность антитела. В анализе DSF используется температурный диапазон от 20 до 95°C, чтобы вызвать разворачивание белка, и оцениваются переходы тепловых состояний путем измерения профиля флуоресценции образца в процессе увеличения теплового стресса. Переход конформационного состояния можно выявить, когда наблюдается дискретное изменение профиля собственной флуоресценции. Это дискретное изменение обусловлено, прежде всего, изменением локального химического окружения вокруг гидрофобных ароматических остатков (например, триптофана), возникающим в результате конформационного сдвига. Данные регистрируют путем сравнения барицентрического среднего (baricentric mean, BSM), которое представляет собой среднюю длину волны флуоресцентного излучения, при каждой температуре. Поскольку ароматические остатки становятся доступными в результате разворачивания, энергия флуоресцентного излучения имеет тенденцию к уменьшению. Это позволяет измерять минимальную температуру разворачивания ( $T_{onset}$ ), наблюдаемую при температуре, при которой BSM возрастает выше шумовых флуктуаций, и значения температуры плавления ( $T_m$ ), наблюдаемые при возникновении точек перегиба на кривой зависимости BSM от температуры.

Для оценки коллоидной стабильности белка проводят измерения статического светорассеяния (static light scattering, SLS) на 266 нм и 473 нм. Интенсивность статического светорассеяния от лазеров, используемых для освещения образца, пропорциональна присутствию частиц с размером того же порядка, что и длина волны падающего света. Поэтому этот анализ чувствителен к агрегации белка при изменении температуры. Статическое светорассеяние измеряют на 266 нм для обнаружения частиц агрегатов меньшего размера, а также на 473 нм для обнаружения частиц агрегатов большего размера. По этим данным определяют температуру начала агрегации ( $T_{agg}$ ), которая представляет собой температуру, при которой белок начинает агрегировать. Эти данные лучше всего анализировать по большим изменениям интенсивности подсчета – более высокие значения указывают на то, что больше света было рассеяно из-за ассоциации агрегатов белка. При повышении температуры изменения подсчета SLS обычно объясняются значительной агрегацией белка, минимальные изменения подсчета SLS объясняются частичной агрегацией, а отсутствие изменений подсчета SLS при изменении температуры указывает на незначительную агрегацию белка. Анализ SLS проводили с использованием Notebook Method NB9828p9, дифференциальной сканирующей флуориметрии, статического светорассеяния и капиллярного динамического светорассеяния.

Можно увидеть тенденцию зависимости от pH как у  $T_{onset}$ , так и у  $T_m$ , причем более высокий pH имеет тенденцию увеличивать термическую стабильность, как видно в таблице 16. При pH 5,0 и выше большинство составов показали  $T_{onset} \approx 50^\circ\text{C}$  или выше, что указывает на относительно стабильные основные составы. При сравнении значений pH и  $T_{onset}$  очевидно, что при более высоком pH требуется больше тепловой энергии, чтобы вызвать разворачивание белка, и эта тенденция сохраняется вплоть до pH  $\sim 6,5$ , где значения как  $T_m$ , так и  $T_{onset}$  выходят на плато. Вполне вероятно, что более низкий pH смещает поверхностные и доступные растворителю заряды боковых цепей аминокислот, а именно Asp (pK=3,9), Glu (pK=4,2) и His (pK=6,0), что приводит к индукции и нарушению электростатических взаимодействий, которые дестабилизируют нативную укладку белка. Значения  $T_{agg}$  SLS регистрировали при двух длинах падающей волны, 266 нм и 473 нм соответственно, и измеряли во время изменения температуры от 20 до  $95^\circ\text{C}$  одновременно с DSF. Это позволило проанализировать склонность к агрегации белка и коллоидную стабильность антитела в каждом составе. Наблюдали различия с тенденцией к тому, что более высокий pH характеризовался более высокой  $T_{agg}$  для обеих длин волн; смотри таблицу 16.

Таблица 16. Результаты DSF и SLS

Состав	Ср. T <sub>onset</sub> (°C)	Ср. T <sub>m1</sub> (°C)	Ср. T <sub>m2</sub> (°C)	Агрегация по SLS на 266		Агрегация по SLS на 473	
				нм (°C)	нм (подсчет)	нм (°C)	нм (подсчет)
1	42,4	58,7	83,7	0,0	0,0E+00	0,0	0,0E+00
2	48,1	61,6	н/о	59,0	1,6E+03	0,0	0,0E+00
3	47,2	59,3	н/о	58,2	1,5E+03	0,0	0,0E+00
4	50,3	61,3	н/о	60,2	3,0E+03	59,5	5,0E+02
5	52,0	62,7	н/о	62,1	5,0E+05	63,1	8,0E+04
6	49,2	61,2	н/о	59,2	1,0E+05	62,4	1,0E+04
7	49,8	61,5	н/о	61,6	4,0E+05	62,7	4,0E+04
8	51,9	61,2	н/о	58,1	2,4E+03	60,1	3,5E+02
9	50,9	63,0	н/о	61,6	5,0E+05	62,0	9,0E+04
10	53,5	63,0	н/о	55,3	4,5E+03	57,0	7,0E+02
11	51,9	63,0	н/о	61,2	5,0E+05	61,7	9,0E+04
12	53,8	63,6	н/о	59,8	6,0E+03	60,9	8,0E+02
13	53,9	64,1	н/о	63,4	5,0E+05	62,9	8,0E+04
14	52,4	63,3	н/о	62,5	5,0E+05	62,1	9,0E+04
15	53,0	63,9	н/о	64,4	4,5E+05	63,0	6,0E+04
16	53,4	63,4	н/о	61,5	4,6E+05	63,0	6,0E+04

В целом, данные DSF показывают, что значения рН ниже 5,0 предполагают значения T<sub>onset</sub> ниже 50°C, причем выше этого значения эффект уменьшается. Значения T<sub>agg</sub>, полученные из SLS, показывают, что составы, содержащие ацетат, глутамат, сукцинат и гистидин (также соответствующие диапазону рН ≤6,5), характеризовались меньшей склонностью к агрегации и более высокими температурами начала агрегации по сравнению с другими буферными системами. Кроме того, более высокие значения рН имеют тенденцию коррелировать с дезамидированием, что позволяет предположить, что особенно предпочтительным диапазоном рН является от 5,0 до 6,5.

**Пример 17. Термическая стабильность и коллоидная стабильность с дополнительными вспомогательными веществами**

Получали различные составы с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (20 мг/мл) с различным рН (глутамат с рН=5,0, сукцинат с рН=5,5, гистидин с рН=5,5 и

гистидин с  $pH=6,0$ ) и набором различных вспомогательных веществ (NaCl, аргинин, сорбит и сахароза), смотри таблицу 17.

Таблица 17. Тестовые составы с различными буферами, значениями  $pH$  и вспомогательными веществами

Состав	Буфер	$pH$	Вспомогательное вещество
A	20 мМ глутамата	$pH$ 5,0	150 мМ NaCl
B			150 мМ Arg
C			250 мМ сорбита
D			250 мМ сахарозы
E	20 мМ сукцината	$pH$ 5,5	150 мМ NaCl
F			150 мМ Arg
G			250 мМ сорбита
H			250 мМ сахарозы
I	20 мМ гистидина	$pH$ 5,5	150 мМ NaCl
J			150 мМ Arg
K			250 мМ сорбита
L			250 мМ сахарозы
M		$pH$ 6,0	150 мМ NaCl
N			150 мМ Arg
O			250 мМ сорбита
P			250 мМ сахарозы

Измерения дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и статического светорассеяния (SLS) проводили, как описано в примере 16 выше. Как обобщено в таблице 18 ниже, составы с заряженными вспомогательными веществами (аргинин и NaCl; составы A, B, E, F, I, J, M, N) приводили к более низким значениям как  $T_{onset}$ , так и  $T_m$  по сравнению с соответствующими им составами с неионогенными вспомогательными веществами (сорбит, сахароза).

Таблица 18. Результаты DSF и SLS

Состав	Ср. $T_{onset}$ (°C)	Ср. $T_m$ (°C)	$T_{Agg}$ по SLS на 266 нм (°C)	SLS на 266 нм (подсчет)	$T_{Agg}$ по SLS на 473 нм (°C)	SLS на 473 нм (подсчет)
A	49,7	57,5	60,2	5,0E+05	62,0	1,7E+04

B	48,2	59,8	61,4	4,5E+05	62,0	1,3E+04
C	51,1	62,4	60,5	2,2E+03	н/д	2,1E+01
D	52,4	62,6	61,1	2,1E+03	н/д	2,5E+01
E	52,3	62,9	62,7	5,0E+05	63,6	2,0E+04
F	51,6	61,2	62,9	4,6E+05	63,5	1,6E+04
G	53,2	63,8	65,5	4,6E+05	65,5	1,0E+04
H	54,8	63,9	65,1	4,6E+05	65,8	1,2E+04
I	47,6	60,4	59,7	4,5E+05	61,7	1,0E+04
J	46,7	56,5	60,9	4,1E+05	62,0	8,1E+03
K	52,6	61,9	61,4	2,0E+03	н/д	2,8E+01
L	51,4	62,8	59,7	1,8E+03	н/д	2,0E+01
M	51,7	61,4	61,8	5,0E+05	63,8	2,7E+04
N	48,6	60,7	63,5	4,6E+05	63,6	1,1E+04
O	53,7	64,3	61,4	2,7E+03	н/д	2,0E+01
P	53,0	64,6	62,0	2,5E+03	н/д	2,0E+01

Аналогично, как показало SLS, неионогенные вспомогательные вещества демонстрировали более низкую степень агрегации на 266 нм, а на 473 нм агрегации не было обнаружено (за исключением составов на основе сукцината). В целом, составы с неионогенными вспомогательными веществами показали превосходную термическую стабильность, причем буферные средства среди протестированных составов ранжируются в порядке гистидин, глутамат и сукцинат.

**Пример 18. Растворимость, термическая стабильность, коллоидная стабильность различных составов**

Получали различные составы с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (20 мг/мл) в соответствии с таблицей 19 ниже.

Таблица 19. Тестовые составы с различными буферами, значениями pH и вспомогательными веществами

Состав	Буфер	pH	Вспомогательное вещество 1	Вспомогательное вещество 2
1	20 мМ	5,0	Сорбит, 250 мМ	-
2	глутамат	5,0	Сахароза, 250 мМ	-
3		5,5	Сорбит, 250 мМ	-
4		5,5	Сорбит, 125 мМ	NaCl, 75 мМ

5	20 мМ	5,5	Arg, 75 мМ	NaCl, 75 мМ
6	гистидин	6,0	Сорбит, 250 мМ	-
7		5,5	Сахароза, 250 мМ	-
8		6,0	Сахароза, 250 мМ	-
9		5,5	Arg, 150 мМ	-
10	20 мМ	5,5	NaCl, 150 мМ	-
11	сукцината	5,5	Сорбит, 250 мМ	-
12		5,5	Сахароза, 250 мМ	-

Составы из таблицы 19 оценивали по динамическому светорассеянию (DLS) для измерения размера и однородности размеров.

Данные обобщены в таблице 20. Средние гидродинамические диаметры находились в диапазоне от 6,4 нм (20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, pH 5,0) до 19,6 нм (20 мМ гистидина, 250 мМ сорбита, pH 6,0). Гидродинамические диаметры мономеров находились в диапазоне от 5,3 нм (20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита pH 5,0) до 13,1 (20 мМ сукцината, 150 мМ NaCl pH 5,5). Средние значения индекса полидисперсности (polydispersity index, PDI) находились в диапазоне от 0,06 (20 мМ гистидина, 125 сорбита, 75 мМ NaCl pH 5,5) до 2,79 (20 мМ гистидина, 250 мМ сорбита, pH 6,0). %PD мономеров находился в диапазоне от 19,6% до 31,4%, что указывает на относительно низкую полидисперсность.

Таблица 20. Результаты DLS

Состав	Средний внешний диаметр (нм)	Средний PDI	Средний диаметр мономеров (нм)	Средний % полидисперсности мономеров	Средний % массы мономеров	Модальность
1	6,4	0,56	5,3	26,5	100,00	Мультимодальная
2	8,2	1,05	7,2	27,0	99,99	Мультимодальная
3	8,9	0,14	6,9	22,1	99,99	Мультимодальная
4	13,2	0,06	11,8	25,4	100,00	Мультимодальная
5	12,3	0,11	12,1	19,6	100,00	Мультимодальная
6	19,6	2,79	6,4	28,8	99,99	Мультимодальная
7	10,2	0,87	8,0	20,7	99,99	Мультимодальная
8	10,6	1,43	7,4	25,0	99,97	Мультимодальная
9	12,8	0,15	11,8	31,4	100,00	Мономодальная
10	13,4	0,11	13,1	26,8	100,00	Мономодальная
11	11,6	0,07	10,4	23,6	100,00	Мономодальная
12	15,8	0,14	12,1	28,3	100,0	Мультимодальная

Четыре из пяти самых высоких средних значений PDI также наблюдались в четырех составах, имеющих самый низкий и самый высокий pH, соответственно (pH 5,0 и pH 6,0), что указывает на то, что значение pH играет значительную роль в растворимости антитела.

Измерения дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и статического светорассеяния (SLS) проводили, как описано в примере 16 выше. Результаты обобщены в таблице 21.

Таблица 21. Результаты DSF и SLS

Состав	Ср. $T_{onset}$ (°C)	Ср. $T_m$ (°C)	$T_{Agg}$ по SLS на 266 нм (°C)	SLS на 266 нм (подсчет)	$T_{Agg}$ по SLS на 473 нм (°C)	SLS на 473 нм (подсчет)
1	3,0E+03	н/д	54,3	62,3	61,9	н/д
2	1,8E+03	н/д	51,0	62,8	61,3	н/д
3	1,4E+03	н/д	52,3	61,9	61,2	н/д
4	3,0E+05	5,5E+03	49,6	58,4	60,5	63,1
5	3,5E+05	5,5E+03	49,6	56,7	60,2	61,7
6	3,3E+03	н/д	55,6	63,8	63,2	н/д
7	2,0E+03	н/д	54,4	62,7	60,7	н/д
8	1,9E+03	н/д	58,4	64,3	62,8	н/д
9	4,0E+05	6,8E+03	53,0	61,8	62,1	63,7
10	4,5E+05	1,2E+04	53,9	62,4	62,1	63,2
11	4,5E+05	5,5E+03	56,4	63,7	63,9	64,5
12	4,5E+05	6,0E+03	56,3	64,7	63,7	65,7

При сравнении значений  $T_{onset}$  и  $T_m$  незаряженные вспомогательные вещества сахара и сорбит имеют тенденцию улучшать стабильность. Что касается SLS, очевидно, что все составы, содержащие незаряженные вспомогательные вещества и или глутамат, или гистидин, демонстрируют отсутствие агрегации на 473 нм и очень низкую сравнительную величину агрегации на 266 нм по сравнению с составами на основе сукцината, содержащими заряженное вспомогательное вещество.

В дополнение к результатам измерений DSF эти данные дополнительно подтверждают роль сахара и сорбита как термостабилизирующих вспомогательных веществ. Составы, содержащие неионогенные вспомогательные вещества и или глутамат, или гистидин, показали в целом лучший профиль характеристик на протяжении всего исследования растворимости. Кроме того, забуференные гистидином и глутаматом составы

с сорбитом или сахарозой в качестве вспомогательных веществ показали самые высокие скорости обмена и концентрации на фазе получения образца, что позволяет предположить, что неионогенные вспомогательные вещества играют роль в солюбилизации антитела.

**Пример 19. Стабильность при хранении различных фармацевтических композиций**

Получали всего 36 составов с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (20 мг/мл), и подвергали их двум вариантам условий хранения,  $5\pm 3^\circ\text{C}$  и  $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$  отн. вл., соответственно, в течение 4-недельного периода. Составы, полученные в этом эксперименте, приведены в таблице 22.

Таблица 22. Тестовые составы с различными буферами, значениями pH, вспомогательными веществами и полисорбатом 80

Состав	Буфер	pH	Вспомогательное вещество 1	Вспомогательное вещество 2	PS80, %	
1	20 мМ глутамата	5,0	250 мМ сорбита	-	0,02	
2			125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02	
3			125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02	
4			150 мМ Arg	-	0,02	
5			250 мМ сахарозы	-	0,02	
6		20 мМ сукцината	5,2	250 мМ сорбита	-	0,02
7				125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
8				125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
9				150 мМ Arg	-	0,02
10				250 мМ сахарозы	-	0,02
11	20 мМ сукцината		5,2	250 мМ сорбита	-	0,02
12				125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
13				125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
14				150 мМ Arg	-	0,02
15				250 мМ сахарозы	-	0,02
16				250 мМ сорбита	-	0,02
17				125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
18				125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
19				150 мМ Arg	-	0,02
20				250 мМ сахарозы	-	0,02

21	20 мМ гистидина	5,5	250 мМ сорбита	-	0,02
22			125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
23			125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
24			150 мМ Arg	-	0,02
25			250 мМ сахарозы	-	0,02
26		5,8	250 мМ сорбита	-	0,02
27			125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
28			125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
29			150 мМ Arg	-	0,02
30			250 мМ сахарозы	-	0,02
31		6,0	250 мМ сорбита	-	0,02
32			125 мМ сорбита	75 мМ NaCl	0,02
33			125 мМ сорбита	75 мМ Arg	0,02
34			150 мМ Arg	-	0,02
35			250 мМ сахарозы	-	0,02
36	20 мМ глутамата	5,0	250 мМ сорбита	-	0,02

Чистоту 4-недельных образцов для обоих условий ( $5\pm 3^\circ\text{C}$  и  $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$  отн. вл.) определяли с помощью эксклюзионной хроматографии (size exclusion chromatography, SEC), и эти данные обобщены в таблице 23.

Таблица 23. Примеси после 4-недельного хранения в различных условиях

Состав	Условия	Мономеры, %	HMW, %	LMW, %	Общий % примесей
1	$5\pm 3^\circ\text{C}$	99,08	0,90	0,02	0,92
	$40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ отн. вл.	98,51	0,91	0,58	1,49
2	$5\pm 3^\circ\text{C}$	99,02	0,96	0,02	0,98
	$40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ отн. вл.	97,32	1,80	0,88	2,68
3	$5\pm 3^\circ\text{C}$	99,02	0,96	0,02	0,98
	$40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ отн. вл.	97,70	1,52	0,78	2,30
4	$5\pm 3^\circ\text{C}$	98,94	1,03	0,03	1,06
	$40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ отн. вл.	96,28	2,79	0,93	3,72
5	$5\pm 3^\circ\text{C}$	99,04	0,94	0,02	0,96
	$40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ отн. вл.	98,38	1,04	0,58	1,62

6	5±3°C	99,11	0,87	0,02	0,89
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	98,49	0,97	0,54	1,51
7	5±3°C	98,96	1,02	0,02	1,04
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,67	1,61	0,72	2,33
8	5±3°C	99,01	0,97	0,02	0,99
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,94	1,41	0,65	2,06
9	5±3°C	98,91	1,06	0,03	1,09
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	96,26	2,92	0,82	3,74
10	5±3°C	99,04	0,94	0,02	0,96
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	98,29	1,17	0,54	1,71
11	5±3°C	98,92	1,05	0,03	1,08
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,58	1,80	0,62	2,42
12	5±3°C	98,84	1,13	0,02	1,16
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	96,97	2,21	0,81	3,03
13	5±3°C	99,03	0,95	0,02	0,97
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,67	1,67	0,66	2,33
14	5±3°C	98,95	1,03	0,02	1,05
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	96,47	2,77	0,76	3,53
15	5±3°C	98,92	1,05	0,03	1,08
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,46	1,92	0,62	2,54
16	5±3°C	98,76	1,21	0,04	1,24
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,89	1,47	0,64	2,11
17	5±3°C	98,65	1,32	0,03	1,35
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	96,83	2,37	0,80	3,17
18	5±3°C	99,00	0,98	0,03	1,00
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,92	1,52	0,57	2,08
19	5±3°C	98,95	1,03	0,02	1,05
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	96,81	2,55	0,64	3,19
20	5±3°C	98,81	1,17	0,03	1,19
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	97,54	1,87	0,60	2,46
21	5±3°C	98,75	1,20	0,04	1,25
	40±2°C/75±5% ОТН. ВЛ.	95,53	3,65	0,82	4,47
22	5±3°C	99,06	0,92	0,02	0,94

	40±2°C/75±5% отн. вл.	97,68	1,70	0,62	2,32
23	5±3°C	99,00	0,99	0,01	1,00
	40±2°C/75±5% отн. вл.	96,43	2,95	0,62	3,57
24	5±3°C	98,93	1,06	0,02	1,07
	40±2°C/75±5% отн. вл.	94,85	4,35	0,80	5,15
25	5±3°C	99,07	0,92	0,02	0,93
	40±2°C/75±5% отн. вл.	98,24	1,27	0,49	1,76
26	5±3°C	99,07	0,91	0,02	0,93
	40±2°C/75±5% отн. вл.	98,39	1,18	0,43	1,61
27	5±3°C	98,95	1,03	0,02	1,05
	40±2°C/75±5% отн. вл.	96,78	2,68	0,54	3,22
28	5±3°C	98,89	1,09	0,02	1,11
	40±2°C/75±5% отн. вл.	95,53	3,89	0,58	4,47
29	5±3°C	98,85	1,13	0,02	1,15
	40±2°C/75±5% отн. вл.	95,26	4,05	0,69	4,74
30	5±3°C	99,03	0,95	0,02	0,97
	40±2°C/75±5% отн. вл.	98,07	1,48	0,45	1,93
31	5±3°C	99,09	0,89	0,02	0,91
	40±2°C/75±5% отн. вл.	98,34	1,22	0,44	1,66
32	5±3°C	98,92	1,06	0,02	1,08
	40±2°C/75±5% отн. вл.	97,11	2,40	0,49	2,89
33	5±3°C	98,87	1,10	0,03	1,13
	40±2°C/75±5% отн. вл.	96,23	3,20	0,57	3,77
34	5±3°C	98,73	1,24	0,03	1,27
	40±2°C/75±5% отн. вл.	94,28	5,06	0,66	5,72
35	5±3°C	98,98	0,99	0,03	1,02
	40±2°C/75±5% отн. вл.	97,76	1,78	0,46	2,24
36	5±3°C	99,17	0,80	0,04	0,83
	40±2°C/75±5% отн. вл.	98,56	0,86	0,58	1,44

В условиях 5±3°C чистота демонстрировала узкий диапазон от 98,5% до 99,2%. Более широкий диапазон чистоты от 94,3% до 98,6% наблюдался для условий 40±2°C/75±5% отн. вл. Составы с 250 мМ сорбита или сахарозы в качестве

вспомогательного вещества, показали наименьшую разницу между двумя условиями, за исключением состава 21 (20 мМ гистидина, 250 мМ сорбита, pH 5,5).

Среди этих составов наблюдается тенденция к корреляции более высокой чистоты с более низким pH в группах вспомогательных веществ. Составы на основе сорбита также немного превосходили составы на основе сахарозы, а составы на основе как глутамата, так и гистидина показали себя лучше, чем составы на основе сукцината.

### **Пример 20. Стабильность при хранении двух предпочтительных фармацевтических композиций**

Целью этого примера является исследование стабильности bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR в течение 3, 6 и 12 месяцев в концентрации 20 мг/мл в двух отдельных составах: 20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS80, pH 5,2, и 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS80, pH 5,5. Эти составы представляют собой составы 6 и 25, соответственно, из таблицы 22 выше.

Для получения образцов этих двух составов объем антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR подвергали диализу в буфер для состава (20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS80, pH 5,2, или 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS80, pH 5,5) при комнатной температуре при минимальном соотношении буфера к объему образца 40. После диализа было подтверждено, что pH составляет  $5,2 \pm 0,1$  для состава 6 и 5,5 для состава 25. Концентрацию материала доводили до  $20 \pm 2$  мг/мл, добавляли PS80 до конечной концентрации 0,02%, и, наконец, фильтровали через PVDF-фильтр 0,22 мкм в шкафу с ламинарным потоком. Образцы по отдельности помещали в стеклянные флаконы типа I емкостью 2 мл до объема 1 мл и проверяли на стабильность в течение вплоть до 12 месяцев.

Флаконы, содержащие составы, хранили в вертикальном положении в течение 12 месяцев при  $-75^\circ\text{C}$  и в течение 6 месяцев при  $5^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}/60\%$  отн. вл. и  $40^\circ\text{C}/75\%$  отн. вл. На начало отсчета времени (T0) отдельные образцы были подвергнуты пяти циклам замораживания/оттаивания, 48-часовому перемешиванию (с контролем) или типичными условиям хранения ( $5^\circ\text{C}$ ). Стабильность образцов анализировали, и результаты обобщили в таблицах 24.

Таблица 24. Стабильность после 3, 6 и 12 месяцев хранения в различных условиях.

Состав 6: 20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS-80, pH 5,2				
Способ	T0			
	Выпуск	Замораживание/оттаивание 5 раз	Перемешивание 48 часов	48 часов без перемешивания

				(контроль)
<b>Внешний вид (визуально)</b>				
Цвет	Бесцветное	Бесцветное	Бесцветное	Бесцветное
Прозрачность	Прозрачное	Прозрачное	Прозрачное	Прозрачное
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
рН	5,3	5,2	5,2	5,2
Осмоляльность (мОсм/кг)	305	302	303	303
Концентрация (UV <sub>280</sub> )	19,5	19,5	19,3	19,3
Мутность (A <sub>550</sub> )	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Число частиц - MFI</b>				
2 мкм	4820	1022	1454	1234
5 мкм	945	123	192	235
10 мкм	247	28	31	55
25 мкм	33	2	4	11
<b>Чистота - SEC</b>				
Мономеры, %	98,3	98,9	99,0	98,9
HMW, %	1,0	1,0	0,9	1,0
LMW, %	0,1	0,1	0,0	0,1
Общее количество примесей	1,0	1,1	1,0	1,1
<b>Чистота - CE-SDS, невосстанавливающий</b>				
Чистота (%)	96,6	95,5	93,9	94,2
Примеси со стороны ввода (%)	3,1	3,6	4,6	4,8
Примеси со стороны выхода (%)	0,3	0,9	1,5	1,0
Общее количество примесей (%)	3,4	4,5	6,1	5,8
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,8	99,7	99,7	99,7
Примеси (%)	0,2	0,3	0,3	0,3
<b>Неоднородность заряда - iIEF</b>				

Главный пик (%)	41,6	42,9	41,8	42,4
ТВВ (%)	3,9	2,4	3,1	3,0
ТАВ (%)	54,5	54,7	55,1	54,7
<b>Катионообменная хроматография - СЕХ</b>				
Главный пик (%)	82,9			
ТВВ (%)	2,0			
ТАВ (%)	15,0			

<b>Состав 6: 20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS-80, рН 5,2</b>				
<b>Способ</b>	<b>3 месяца</b>			
	-75±10°C	5±3°C	25±2°C	40±2°C
<b>Внешний вид</b>				
Цвет	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость
Прозрачность	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
рН	5,3	5,2	5,2	5,2
Осмоляльность (мОсм/кг)	-	--	--	--
Концентрация (UV <sub>280</sub> )	20,3	20,6	21,5	19,8
Мутность (A <sub>550</sub> )	0,00	0,00	0,01	0,01
<b>Число частиц - МFI</b>				
2 мкм	1712	1529	2318	1791
5 мкм	490	356	399	491
10 мкм	160	104	84	168
25 мкм	5	9	19	15
<b>Чистота - SEC</b>				
Мономеры, %	99,0	98,9	98,7	95,8
НМВ, %	0,9	0,9	0,9	1,9
ЛМВ, %	0,1	0,1	0,4	2,3
Общее количество	1,0	1,1	1,3	4,2

примесей				
<b>Чистота - CE-SDS, невосстанавливающий</b>				
Чистота (%)	95,9	95,7	94,9	88,5
Примеси со стороны ввода (%)	3,9	3,9	3,3	11,3
Примеси со стороны выхода (%)	0,1	0,3	0,2	0,2
Общее количество примесей (%)	4,1	4,3	3,4	11,5
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,3	99,3	99,0	92,2
Примеси (%)	0,7	0,7	1,0	7,8
<b>Неоднородность заряда - icIEF</b>				
Главный пик (%)	43,7	43,4	36,3	9,8
TBV (%)	3,3	3,3	3,7	2,4
TAV (%)	53,0	53,3	60,0	87,8
<b>Катионообменная хроматография – СЕХ</b>				
Главный пик (%)	83,1	84,7	78,0	39,0
TBV (%)	2,7	2,4	2,5	1,5
TAV (%)	14,2	12,8	19,6	59,4

<b>Состав 6: 20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS-80, pH 5,2</b>				
Способ	6 месяцев			12 месяцев
	5±3°C	25±2°C	40±2°C	-75±10°C
<b>Внешний вид</b>				
Цвет	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость	Очень слегка желтая жидкость	Бесцветная жидкость
Прозрачность	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
pH	5,3	5,3	5,3	5,3

<b>Осмоляльность (мОсм/кг)</b>	-	-	-	--
<b>Концентрация (UV<sub>280</sub>)</b>	18,9	19,1	19,1	20,0
<b>Мутность (A<sub>550</sub>)</b>	0,02	-0,02	0,02	0,01
<b>Число частиц - MFI</b>				
2 мкм	2696	963	3265	1602
5 мкм	304	78	444	233
10 мкм	36	4	40	40
25 мкм	6	4	4	6
<b>Чистота - SEC</b>				
Момеры, %	98,9	98,1	84,3	99,0
HMW, %	0,9	1,2	4,7	0,8
LMW, %	0,1	0,7	11,0	0,1
Общее количество примесей	1,1	1,9	15,7	1,0
<b>Чистота - CE-SDS, невосстанавливающий</b>				
Чистота (%)	94,7	92,2	76,0	97,6
Примеси со стороны ввода (%)	4,9	7,4	23,4	1,9
Примеси со стороны выхода (%)	0,4	0,4	0,7	0,5
Общее количество примесей (%)	5,3	7,8	24,0	2,4
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,2	97,7	81,8	99,5
Примеси (%)	0,8	2,3	18,2	0,5
<b>Неоднородность заряда - icIEF</b>				
Главный пик (%)	39,3	27,2	4,6	43,3
TBV (%)	3,8	4,1	Не обнаружено	3,2
TAV (%)	56,9	68,6	95,4	53,6
<b>Катионообменная хроматография – СЕХ</b>				

Главный пик (%)	81,9	66,2	12,4	82,2
TBV (%)	2,2	2,6	1,4	2,2
TAV (%)	15,9	31,1	86,3	15,6

<b>Состав 25: 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS-80, pH 5,5</b>				
<b>Способ</b>	<b>T0</b>			
	Выпуск	Замораживание/оттаивание 5 раз	Перемешивание 48 часов	48 часов без перемешивания (контроль)
<b>Внешний вид</b>				
Цвет	Бесцветное	Бесцветное	Бесцветное	Бесцветное
Прозрачность	Прозрачное	Прозрачное	Прозрачное	Прозрачное
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
pH	5,5	5,4	5,5	5,4
Осмоляльность (мОсм/кг)	299	296	295	297
Концентрация (UV <sub>280</sub> )	19,2	19,3	19,1	19,4
Мутность (A <sub>550</sub> )	0,01	0,04	0,02	0,01
<b>Число частиц - MFI</b>				
2 мкм	1061	3257	1510	775
5 мкм	146	593	237	96
10 мкм	32	151	64	24
25 мкм	3	28	16	4
<b>Чистота - SEC</b>				
Мономеры, %	99,0	99,0	97,8	98,9
HMW, %	1,0	1,0	0,9	0,9
LMW, %	0,1	0,1	0,1	0,1
Общее количество примесей	1,1	1,1	1,0	1,1
<b>Чистота - CE-SDS, невосстанавливающий</b>				
Чистота (%)	96,6	95,5	87,8	95,5
Примеси со стороны ввода (%)	2,8	3,7	10,2	3,9
Примеси со	0,5	0,8	2,0	0,6

стороны выхода (%)				
Общее количество примесей (%)	3,4	4,5	12,2	4,5
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,7	99,7	99,7	99,7
Примеси (%)	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Неоднородность заряда - iсIEF</b>				
Главный пик (%)	42,0	42,2	42,4	42,4
TBV (%)	3,2	3,0	3,0	3,1
TAV (%)	54,8	54,8	54,6	54,6
<b>Катионообменная хроматография - СЕХ</b>				
Главный пик (%)	82,8			
TBV (%)	2,0			
TAV (%)	15,2			

<b>Состав 25: 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS-80, рН 5,5</b>				
<b>Способ</b>	<b>3 месяца</b>			
	<b>-75±10°C</b>	<b>5±3°C</b>	<b>25±2°C</b>	<b>40±2°C</b>
<b>Внешний вид</b>				
Цвет	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость	Бесцветная жидкость	Слегка желтое
Прозрачность	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
<b>рН</b>	5,4	5,4	5,4	5,4
<b>Осмоляльность (мОсм/кг)</b>	--	--	--	--
<b>Концентрация (UV<sub>280</sub>)</b>	19,6	19,9	19,6	19,7
<b>Мутность (A<sub>550</sub>)</b>	0,00	-0,02	-0,02	-0,02
<b>Число частиц - MFI</b>				
2 мкм	1303	2176	2607	3732
5 мкм	272	552	766	748

10 мкм	67	196	282	252
25 мкм	3	34	62	61
<b>Чистота - SEC</b>				
Мономеры, %	99,0	99,0	98,8	95,9
HMW, %	0,9	0,9	0,9	2,0
LMW, %	0,1	0,1	0,3	2,1
Общее количество примесей	1,0	1,0	1,2	4,1
<b>Чистота - CE-SDS, невосстанавливающий</b>				
Чистота (%)	96,0	95,9	95,3	89,8
Примеси со стороны ввода (%)	3,7	3,9	4,6	10,1
Примеси со стороны выхода (%)	0,2	0,2	0,2	0,2
Общее количество примесей (%)	3,9	4,1	4,7	10,2
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,0	99,3	99,1	93,3
Примеси (%)	1,0	0,7	0,9	6,7
<b>Неоднородность заряда - iCIEF</b>				
Главный пик (%)	43,0	43,4	37,7	9,4
TBV (%)	3,5	3,2	3,4	1,4
TAV (%)	53,5	53,4	58,9	89,2
<b>Катионообменная хроматография – СЕХ</b>				
Главный пик (%)	85,0	85,9	78,5	56,0
TBV (%)	2,1	1,7	0,7	1,7
TAV (%)	12,9	12,4	20,9	42,2

<b>Состав 25: 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS-80, pH 5,5</b>				
<b>Способ</b>	<b>6 месяцев</b>			<b>12 месяцев</b>
	5±3°C	25±2°C	40±2°C	-75±10°C
<b>Внешний вид</b>				
Цвет	Бесцветная жидкость	Очень слегка желтая	От слегка желтого до	Бесцветная жидкость

		жидкость	желтого	
Прозрачность	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость
Частицы	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц	Нет видимых частиц
рН	5,5	5,5	5,4	5,4
Осмоляльность (мОсм/кг)	-	-	-	--
концентрация (UV <sub>280</sub> )	18,7	18,9	17,6	19,2
Мутность (A <sub>550</sub> )	-0,30	0,00	-0,01	0,03
<b>Число частиц - MFI</b>				
2 мкм	1859	2195	3529	1715
5 мкм	275	340	403	178
10 мкм	19	34	29	50
25 мкм	2	6	6	10
<b>Чистота - SEC</b>				
Момеры, %	98,9	98,3	83,1	99,0
HMW, %	1,0	1,1	6,4	0,9
LMW, %	0,1	0,6	10,6	0,1
Общее количество примесей	1,1	1,7	16,9	1,0
<b>Чистота - CE-SDS, невозстанавливающий</b>				
Чистота (%)	94,9	93,0	77,0	97,9
Примеси со стороны ввода (%)	4,7	6,7	22,4	1,7
Примеси со стороны выхода (%)	0,4	0,3	0,7	0,4
Общее количество примесей (%)	5,1	7,0	23,0	2,1
<b>Чистота - CE-SDS, восстанавливающий</b>				
Чистота (%)	99,0	98,1	83,8	99,6
Примеси (%)	1,0	1,9	16,2	0,4

<b>Неоднородность заряда - icIEF</b>				
Главный пик (%)	41,5	28,5	3,6	40,3
TBV (%)	3,2	3,9	Не обнаружено	3,4
TAV (%)	55,3	67,6	96,4	56,3
<b>Катионообменная хроматография – СЕХ</b>				
Главный пик (%)	81,5	68,4	30,0	82,3
TBV (%)	2,2	2,8	2,9	2,1
TAV (%)	16,3	28,9	67,1	15,6

В целом, оба состава продемонстрировали минимальные изменения в условиях 5-кратного замораживания/оттаивания и 48-часового перемешивания по сравнению с исходным образцом (выпуск) или соответствующим контролем. Кроме того, оба состава продемонстрировали минимальные изменения в стабильности продукта при хранении при температуре  $-75^{\circ}\text{C}$  в течение 12 месяцев, при  $5^{\circ}\text{C}$  в течение 6 месяцев и, в несколько меньшей степени, при  $25^{\circ}\text{C}/60\%$  отн. вл. в течение 6 месяцев.

Данные SEC показывают, что при  $40^{\circ}\text{C}$  состав 6 немного лучше, чем состав 25, причем общее количество примесей составляет 15,7% для состава 6 и 16,9% для состава 25.

В целом результаты показали, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, 20 мг/мл, стабильно в 20 мМ глутамата, 250 мМ сорбита, 0,02% PS80, pH 5,2, или 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 0,02% PS80, pH 5,5, при номинальных условиях в течение вплоть до 12 месяцев.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
  - a) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3,
  - b) буферное средство,причем рН данной композиции составляет от 4,0 до 8,0.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой указанные антигенсвязывающие области, способные связываться с человеческим В7Н4 и человеческим CD3, содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, причем рН данной композиции составляет от 4,5 до 6,5, например от 5,0 до 6,0, например от 5,2 до 5,5.
4. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой буферное средство выбрано из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей.
5. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, причем данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит с) неионогенное вспомогательное вещество, такое как сахар или сахарный спирт.
6. Фармацевтическая композиция по п. 5, в которой неионогенное вспомогательное вещество выбрано из сорбита, сахарозы или их смесей.
7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 5-6, в которой неионогенное вспомогательное вещество присутствует в концентрации от 100 до 300 мМ, например 125-250 мМ, предпочтительно 250 мМ.
8. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, причем данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит d) поверхностно-активное вещество.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8, в которой поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из моноолеата глицерина, хлорида бензетония, докוזата натрия, фосфолипидов, алкиловых эфиров полиэтилена, лаурилсульфата натрия и трикаприлина, хлорида бензалкония, цетримида, хлорида цетилпиридиния и фосфолипидов, альфа-токоферола, моноолеата глицерина, миристилового спирта, фосфолипидов, полоксамеров, алкиловых эфиров полиоксиэтилена, производных полиоксиэтиленового касторового масла, полиоксиэтиленовых эфиров сорбита и жирных кислот, полиоксиэтиленстеаратов, полиоксилгидроксистеарата, полиоксиглицеридов, полисорбатов, дилаурата пропиленгликоля, монолаурата пропиленгликоля, сложных эфиров сорбита, пальмитата сахарозы, стеарата сахарозы, трикаприлина и TPGS и их смесей.

10. Фармацевтическая композиция по пп. 8 или 9, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, необязательно в которой полисорбат представляет собой полисорбат 20 или 80, предпочтительно полисорбат 80.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-10, в которой поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации от около 0,005% до 0,4% вес/об, например от около 0,01 до 0,1% вес/об, например от около 0,01 до 0,09% вес/об, например от около 0,01 до 0,06% вес/об, например от около 0,01 до 0,05% вес/об, например 0,02% вес/об, или 0,03% вес/об, или 0,04% вес/об, или 0,05% вес/об, предпочтительно 0,02% вес/об.

12. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой концентрация антитела составляет от 0,5 до 100 мг/мл, например от 1,0 до 50 мг/мл или например от 5 до 30 мг/мл, например 5 мг/мл, или 6 мг/мл, или 7 мг/мл, или 8 мг/мл, или 9 мг/мл, или 10 мг/мл, или 11 мг/мл, или 12 мг/мл, или 13 мг/мл, или 14 мг/мл, или 15 мг/мл, или 16 мг/мл, или 17 мг/мл, или 18 мг/мл, или 19 мг/мл, или 20 мг/мл, или 21 мг/мл, или 22 мг/мл, или 23 мг/мл, или 24 мг/мл, или 25 мг/мл, или 26 мг/мл, или 27 мг/мл, или 28 мг/мл, или 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 41 мг/мл, 42 мг/мл, 43 мг/мл, 44 мг/мл, 45 мг/мл, 46 мг/мл, 47 мг/мл, 48 мг/мл, 49 мг/мл, 50 мг/мл, 51 мг/мл, 52 мг/мл, 53 мг/мл, 54 мг/мл, 55 мг/мл, 56 мг/мл, 57 мг/мл, 58 мг/мл, 59 мг/мл или, например, 60 мг/мл.

13. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой буферное средство присутствует в концентрации от 5 до 40 мМ, например 10-30 мМ, предпочтительно 20 мМ.

14. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, причем данная фармацевтическая композиция представляет собой водную композицию.

15. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая:

a) 5-50 мг/мл антитела,

b) от 10 до 20 мМ глутамата или гистидина,

c) от 150 до 350 мМ сорбита или сахарозы,

d) полисорбат,

причем рН данной композиции составляет от 5,0 до 6,0.

16. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, выбранная из группы, состоящей из

фармацевтической композиции, содержащей a) 10-20 мг/мл антитела, b) 20 мМ глутамата, c) 250 мМ сорбита, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,1-5,3, и

фармацевтической композиции, содержащей a) 10-20 мг/мл антитела, b) 20 мМ гистидина, c) 250 мМ сахарозы, d) 0,02% вес/об полисорбата 80, причем рН данной композиции составляет 5,4-5,6.

17. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, причем данная композиция представляет собой жидкую композицию.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-17, причем данная композиция представляет собой внутривенную композицию, и/или причем данная композиция предназначена для применения при внутривенном введении.

19. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, причем данная композиция является стабильной для фармацевтического применения в течение по меньшей мере 6 месяцев, например по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев, при температуре хранения 2-8°C, например 5°C.

20. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело представляет собой биспецифическое антитело.

21. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело представляет собой бивалентное антитело.

22. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17,

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22.

23. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 18, 19 и 21,

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 23, GTN и 24.

24. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17;

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22 или последовательность, характеризующуюся идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по

меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22.

25. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

в) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 36, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 40;

д) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 43, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 47;

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 54; или

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33;

г) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 65, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 69.

26. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33.

27. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

с) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 37, 38 и 39, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 41, DTS и SEQ ID NO: 42;

д) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 44, 45 и 46, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 48, YTS и SEQ ID NO: 49;

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 51, 52 и 53, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 55, GAS и SEQ ID NO: 56; или

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 32 и 28, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35;

г) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 70, GAS и SEQ ID NO: 71.

28. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и

CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 34, GAS и SEQ ID NO: 35.

29. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержит:

a) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

b) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

c) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 36 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 40;

d) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 43 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 47;

e) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 50 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 54; или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33;

g) переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 65 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 69.

30. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и переменную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

31. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

переменную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 18, в которой CDR2 содержит

аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 19 и в которой CDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 21, и

вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 23, в которой CDR2 содержит аминокислотную последовательность GTN и в которой CDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 24, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой CDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 26, в которой CDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30 и в которой CDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 28, и

вариабельную область легкой цепи (VL), в которой CDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 34, в которой CDR2 содержит аминокислотную последовательность GAS и в которой CDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 35.

32. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 22, и

причем антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно, соответственно, SEQ ID NO: 33.

33. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим B7H4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 17 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 22, и причем антигенсвязывающая

область, способная связываться с человеческим В7Н4, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 29 и вариабельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 33.

34. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой

антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, является человеческой и/или

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

35. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL), причем, предпочтительно, данные два константных домена тяжелой цепи и две константные области легкой цепи имеют человеческое происхождение.

36. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело представляет собой полноразмерное антитело.

37. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело имеет изотип IgG1.

38. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем каждая из указанных первой и второй тяжелых цепей содержит по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и CH3, причем в указанной первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и в указанной второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, причем указанные замены в указанной первой и указанной второй тяжелых цепях сделаны не в одних и тех же положениях, и причем положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией Eu.

39. Фармацевтическая композиция по п. 38, в которой аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

40. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит первую и, необязательно, вторую тяжелые цепи, причем данные первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь, если присутствует, модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с идентичным немодифицированным антителом.

41. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляют собой F и E, соответственно.

42. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи, причем как в первой, так и во второй тяжелых цепях аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 в соответствии с нумерацией Eu, представляет собой A.

43. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело содержит легкую цепь лямбда ( $\lambda$ ) и легкую цепь каппа ( $\kappa$ ); например антитело с тяжелой цепью и легкой цепью лямбда, которые содержат область связывания, способную связываться с CD3, и с тяжелой цепью и легкой цепью каппа, которые содержат область связывания, способную связываться с B7H4.

44. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим B7H4, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа; и в которой

указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD3, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда.

45. Фармацевтическая композиция по п. 44, в которой одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO: 60, и другая является такой, как определено в SEQ ID NO: 61, и в которой указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO: 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO: 64.

46. Фармацевтическая композиция по п. 45, в которой у указанных константных областей тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO: 60 и 61, удалены их концевые лизины.

47. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой антитело представляет собой bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или его биоаналог.

48. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-47 для применения в качестве лекарственного средства.

49. Фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства по п. 48 для применения в способе лечения заболевания.

50. Фармацевтическая композиция для применения по п. 49, причем заболевание представляет собой рак, причем, необязательно, рак характеризуется экспрессией B7H4 в раковых клетках, причем, необязательно, рак представляет собой солидную опухоль.

51. Фармацевтическая композиция для применения по п. 50, причем рак выбран из группы, состоящей из рака легких, NSCLC (ADC или SQCC), рака желудка, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака яичников и рака матки.

52. Способ лечения заболевания, причем данный способ включает введение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47 нуждающемуся в этом субъекту.

53. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47 в течение времени, достаточного для лечения данного рака.

54. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47 для лечения рака.

55. Единичная лекарственная форма, содержащая:

а) антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим В7Н4, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD3, причем указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем указанные переменные области тяжелой и легкой цепей являются гуманизированными и/или человеческими, в количестве от 5 пг до 1200 мг,

и

б) буферное средство, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из гистидина, глутамата и их смесей,

причем рН данной единичной лекарственной формы составляет от 4,0 до 8,0, предпочтительно от 4,5 до 6,5, более предпочтительно от 5,0 до 6,0.

56. Единичная лекарственная форма по п. 55, в которой антитело является таким, как определено в любом из пп. 20-47.

57. Единичная лекарственная форма по пп. 55 или 56, в которой количество антитела составляет от 20 мг до 1000 мг, например от 200 мг до 600 мг, например от 300 мг до 400 мг.

58. Набор компонентов, содержащий:

а. фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-47 или единичную лекарственную форму по любому из пп. 55-57,

б. емкость для фармацевтической композиции или для единичной лекарственной формы,

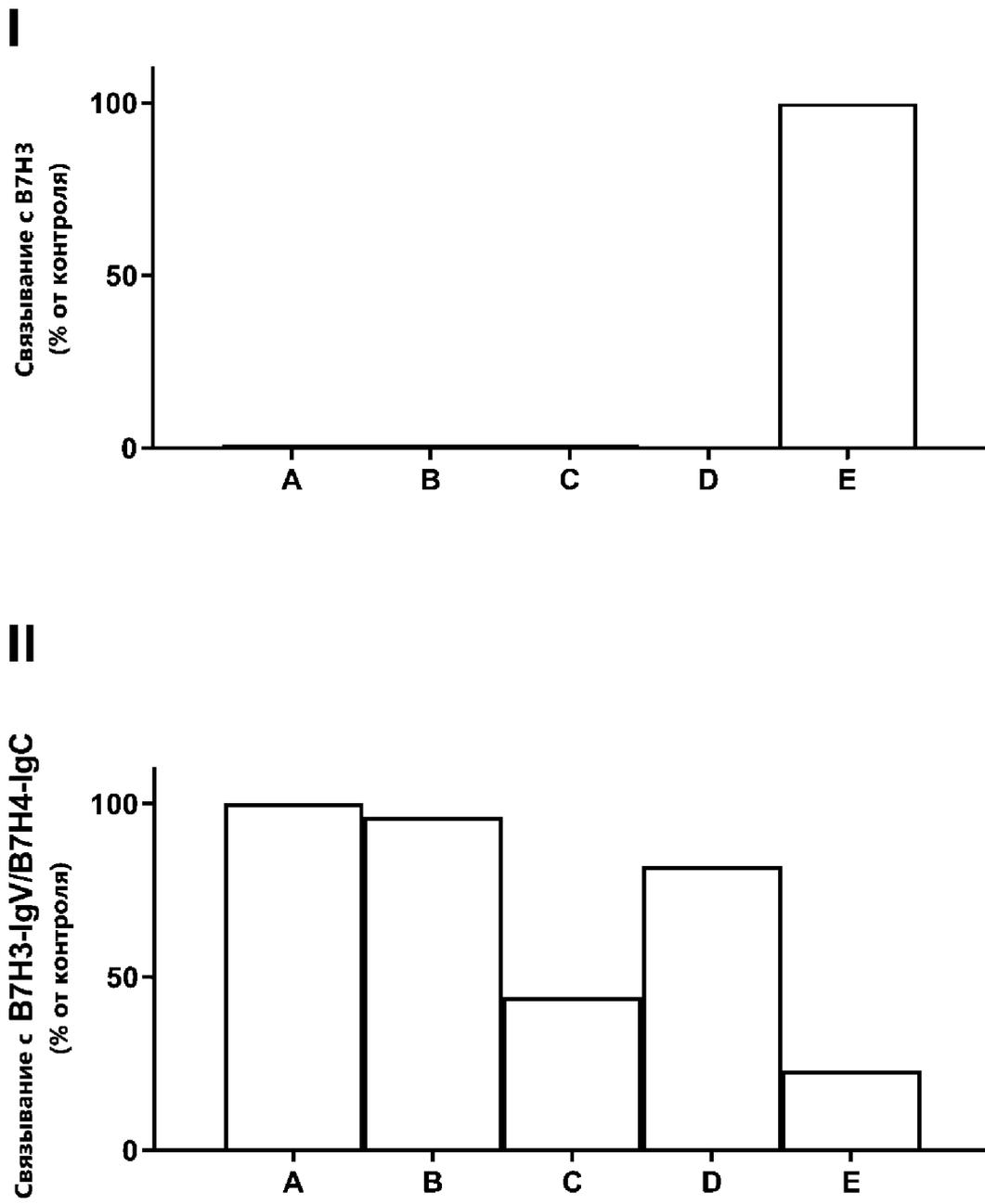
с. инструкции по разбавлению и/или по применению.

59. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-47, содержащий стадии смешивания в воде для инъекций:

а. от 0,5 до 120 мг/мл антитела и

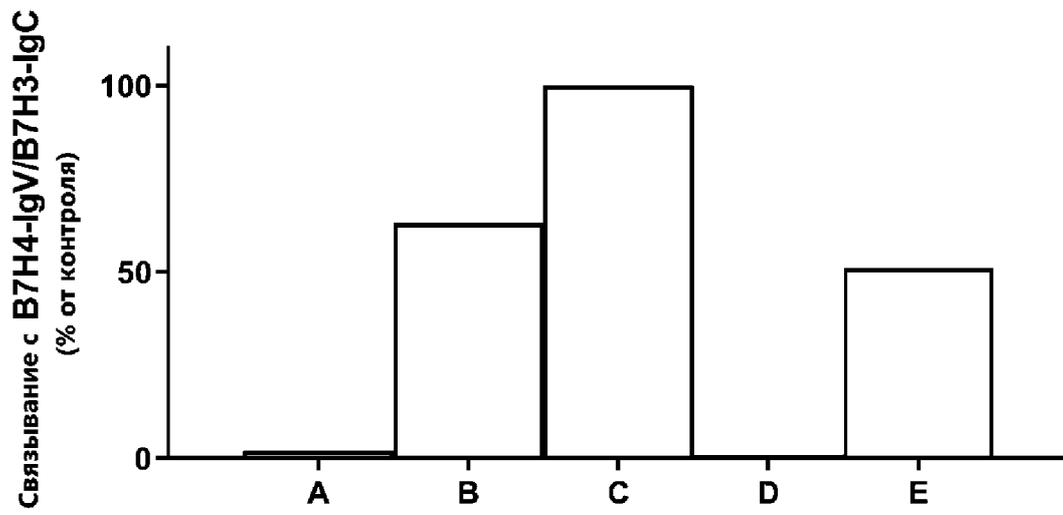
б. буферного средства

и доведения рН до 4,0-8,0, предпочтительно до 5,0-6,0.

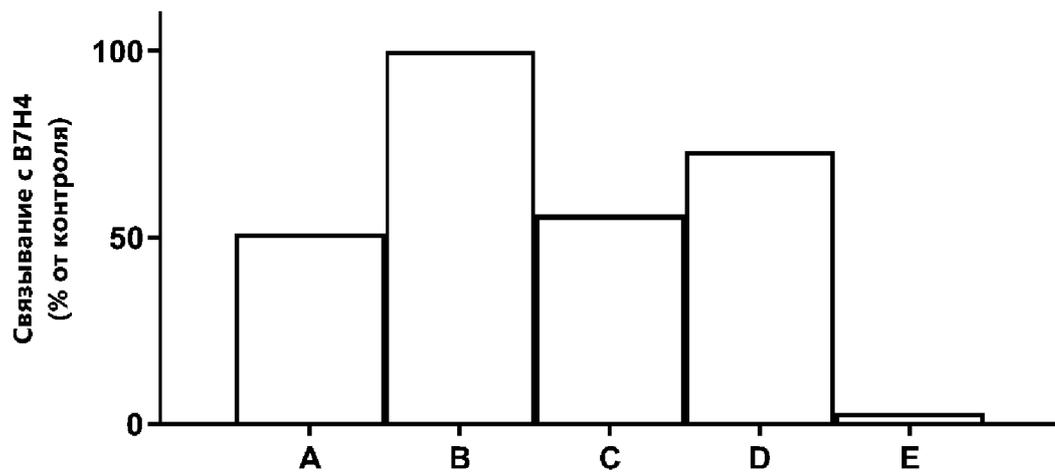


Фиг. 1

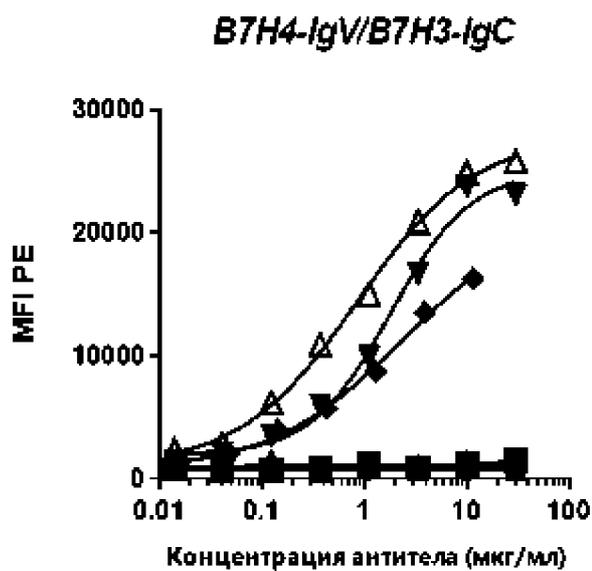
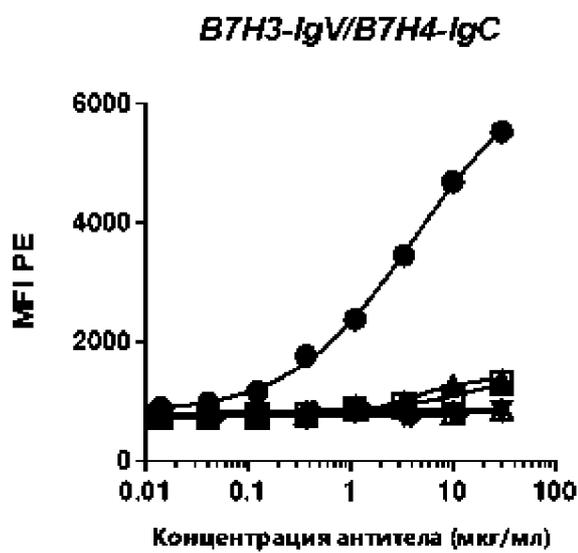
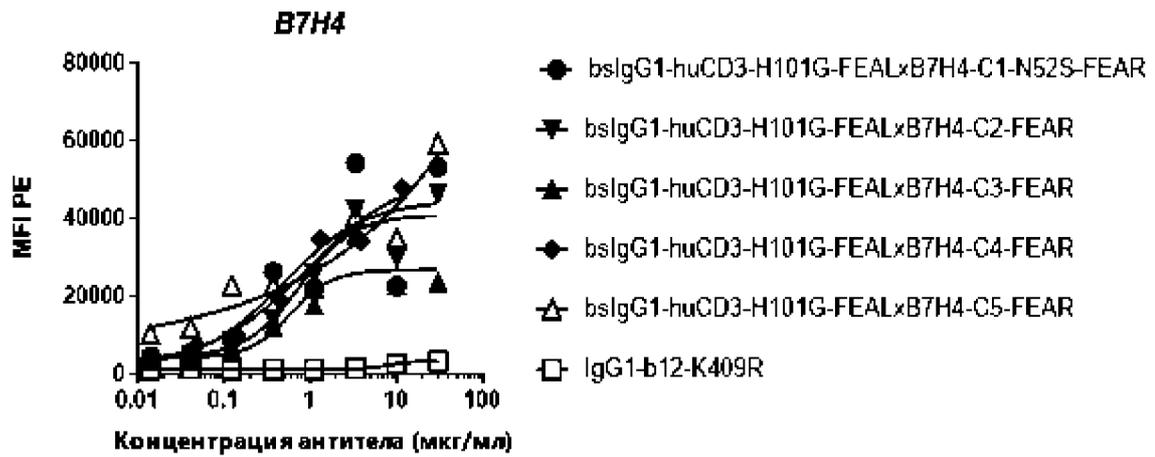
III



IV

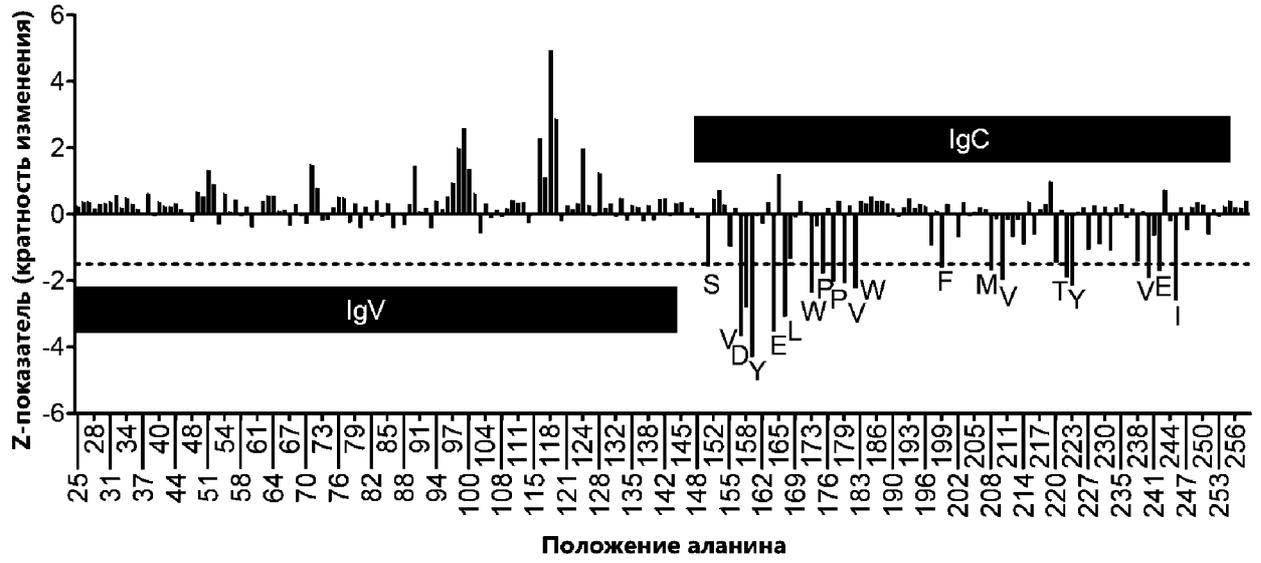


Фиг. 1 (продолжение)



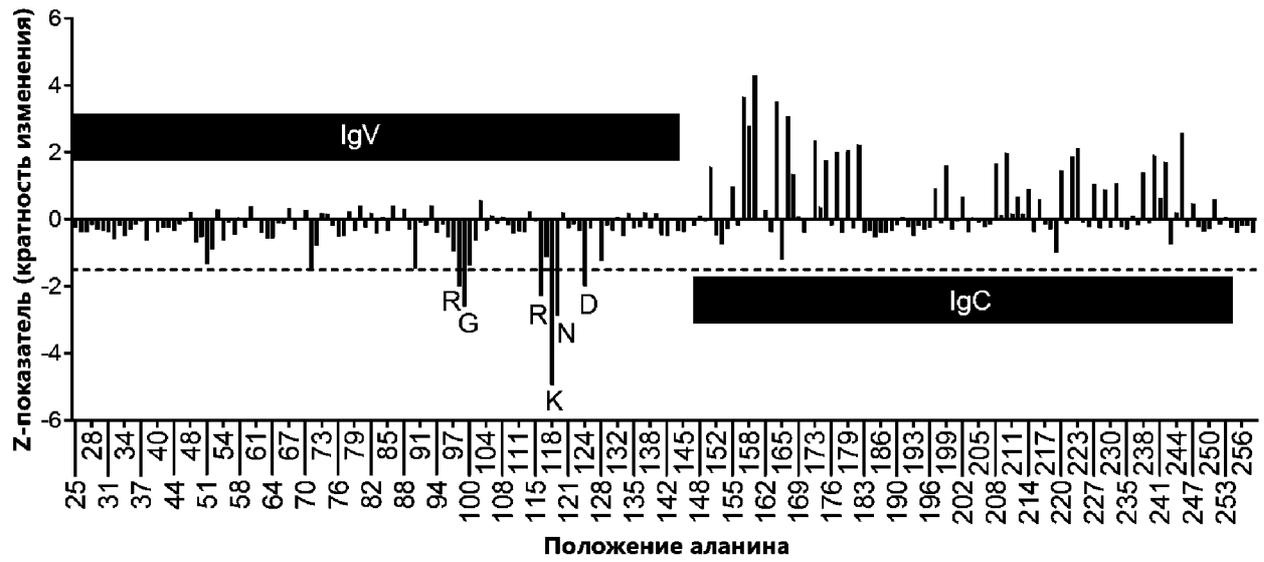
Фиг. 2

## Uni-B7H4-C1-N52S-TE-mNG (эталонное ab: Uni-B7H4-C2-TE-mNG)



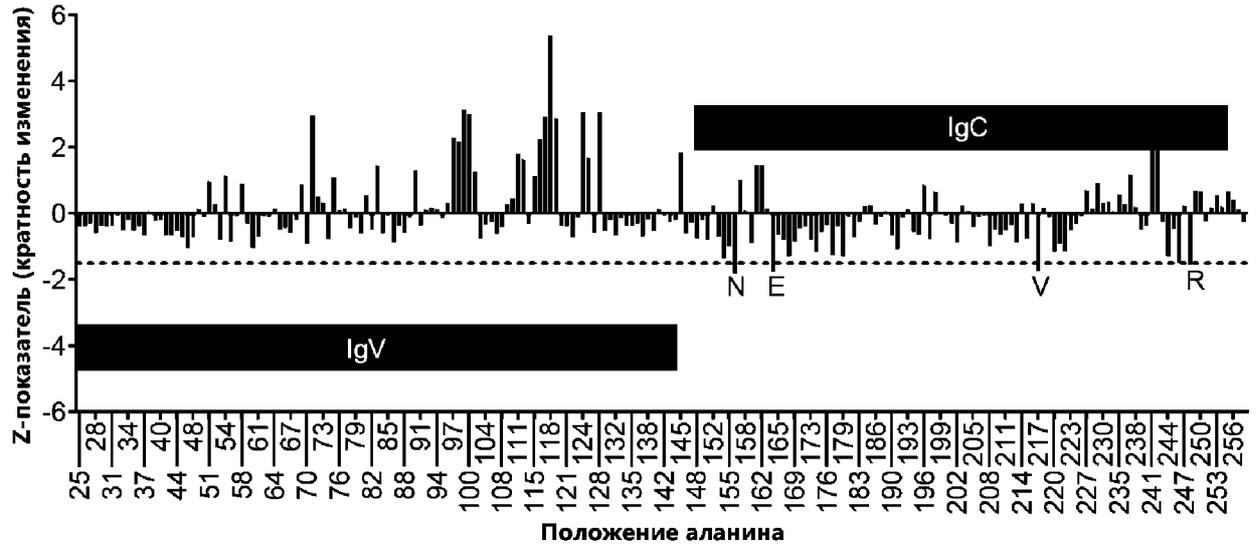
Фиг. 3

## Uni-B7H4-C2-TE-mNG (эталонное ab: Uni-B7H4-C1-N52S-TE-mNG)

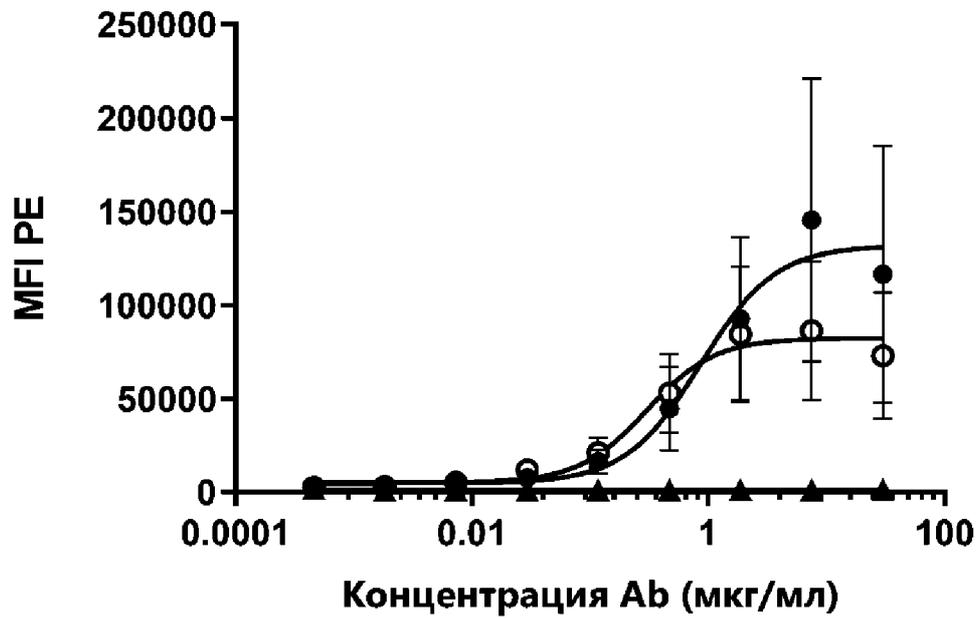
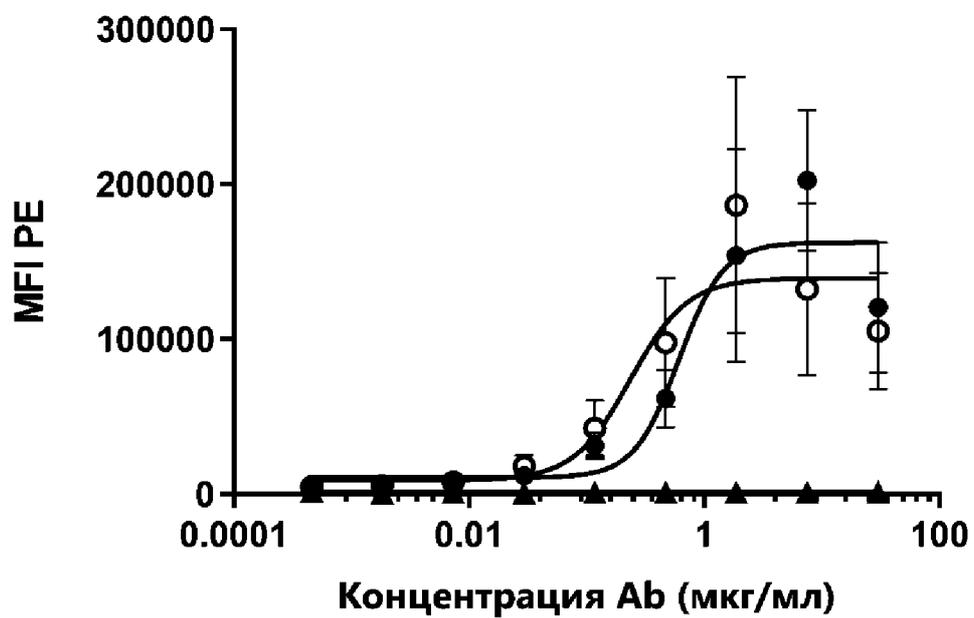


Фиг. 3 (продолжение)

## Uni-B7H4-C3-TE-mNG (эталонное ab: Uni-B7H4-C2-TE-mNG)

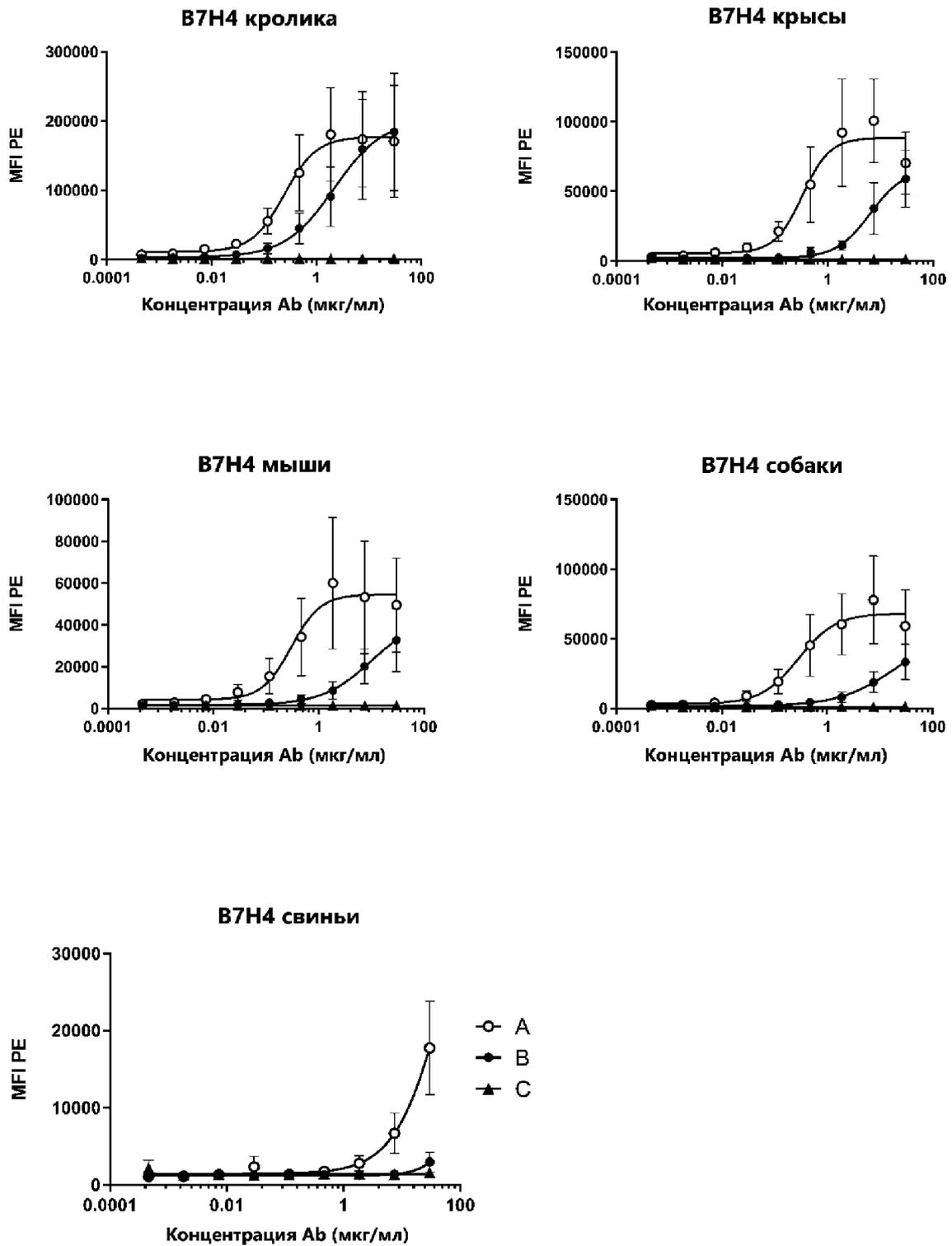


Фиг. 3 (продолжение)

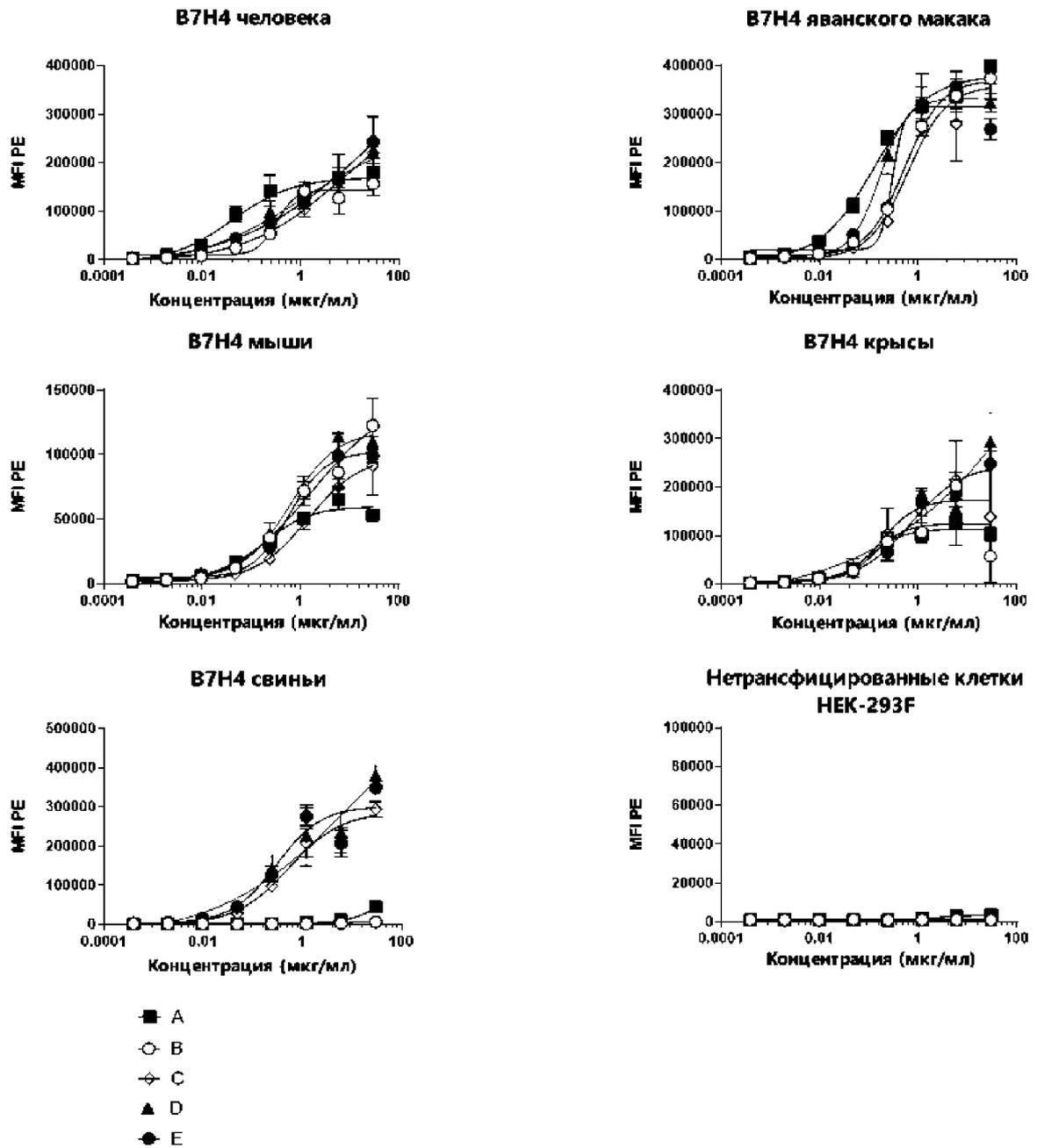
**В7Н4 человека****В7Н4 яванского макака**

- A
- B
- ▲ C

Фиг. 4

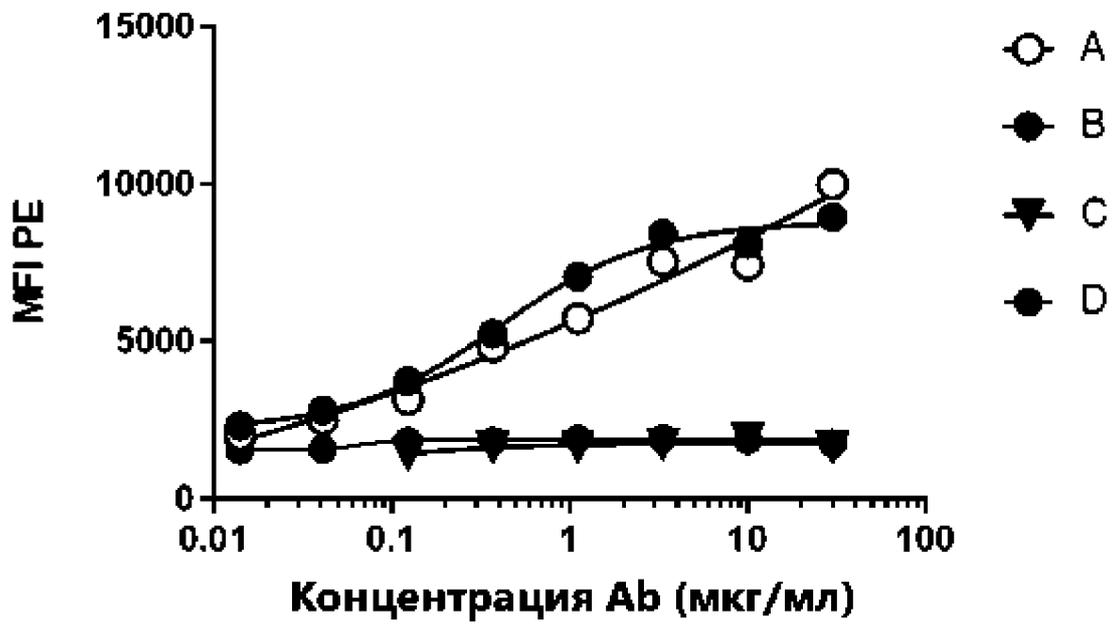


Фиг. 5

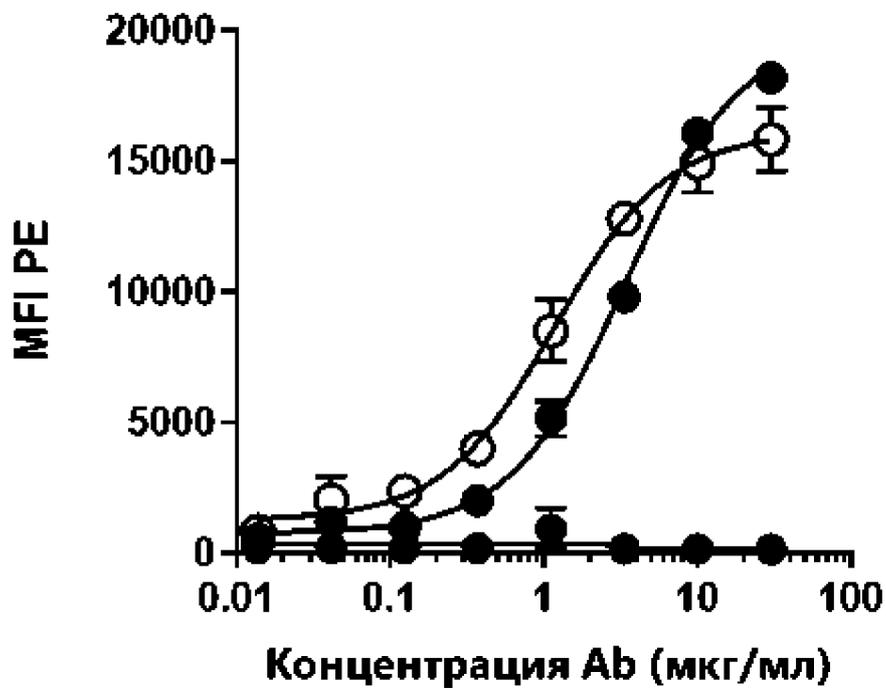


Фиг. 6

## Клетки MCF-7

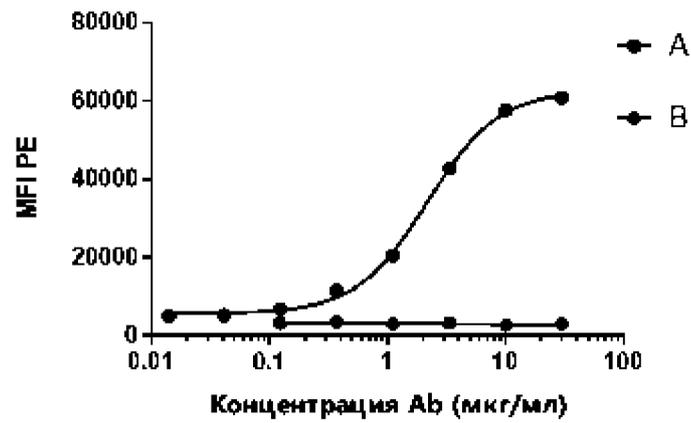


## MDA-MB-468

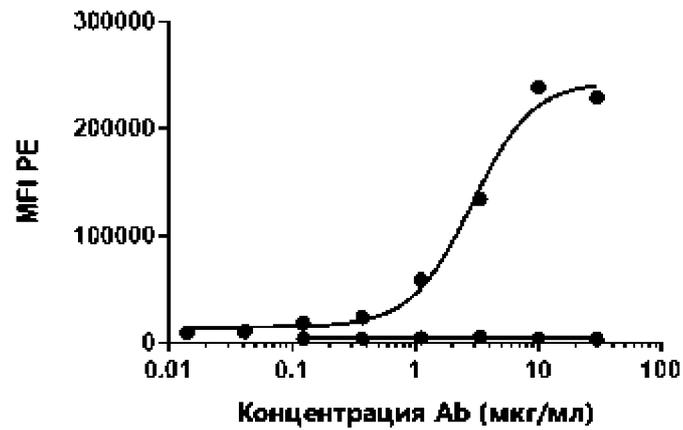


Фиг. 7

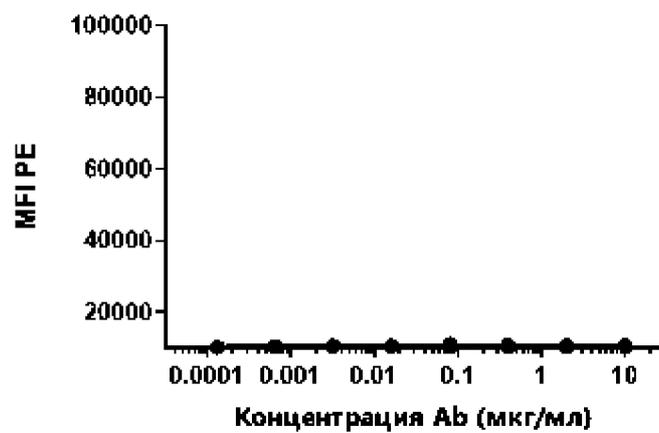
## Клетки NIH-Ovcar-3



## Клетки NCC1954

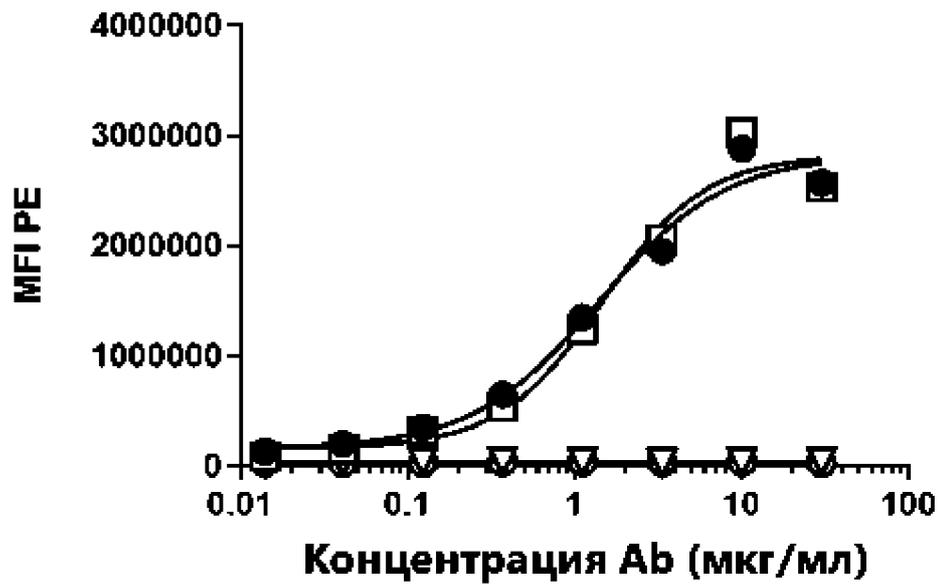


## Клетки HeLa

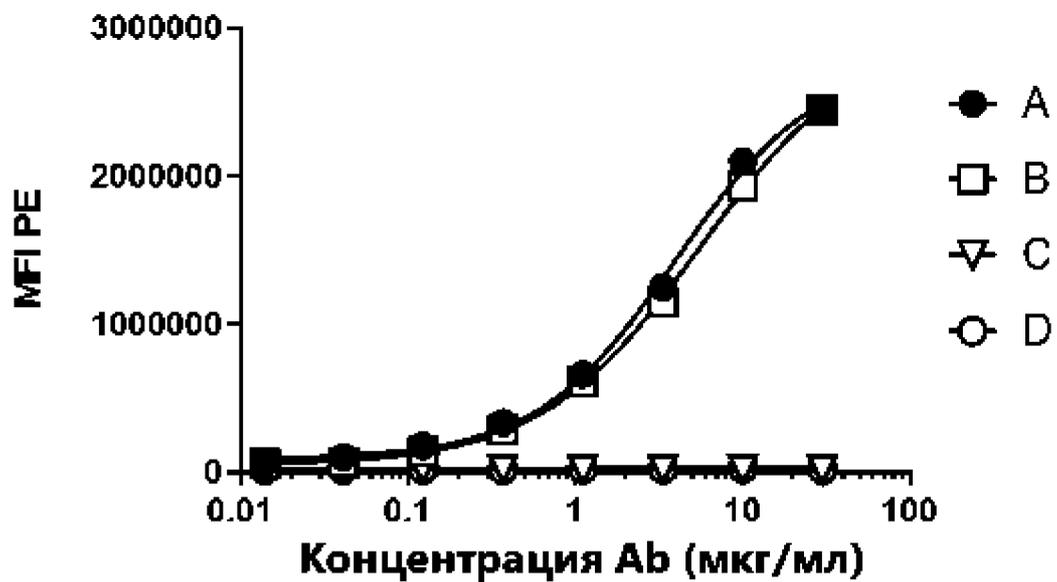


Фиг. 8

## Клетки SK-BR3

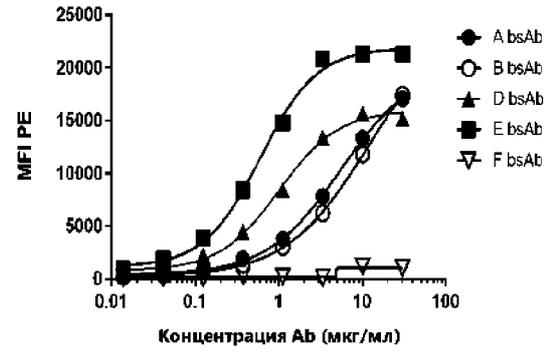
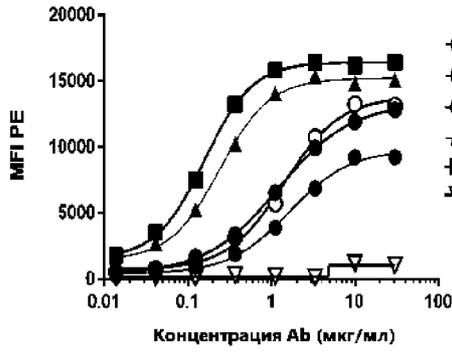


## Клетки MDA-MB-468

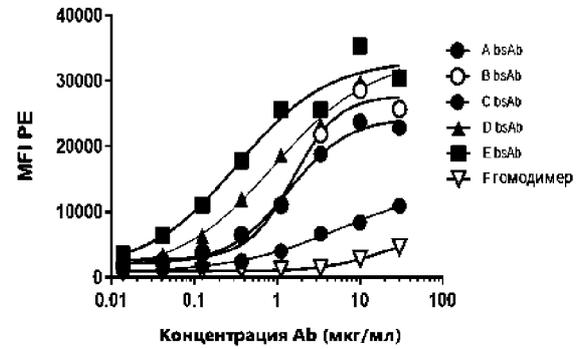
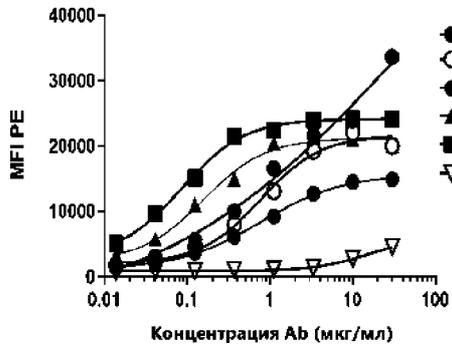


Фиг. 9

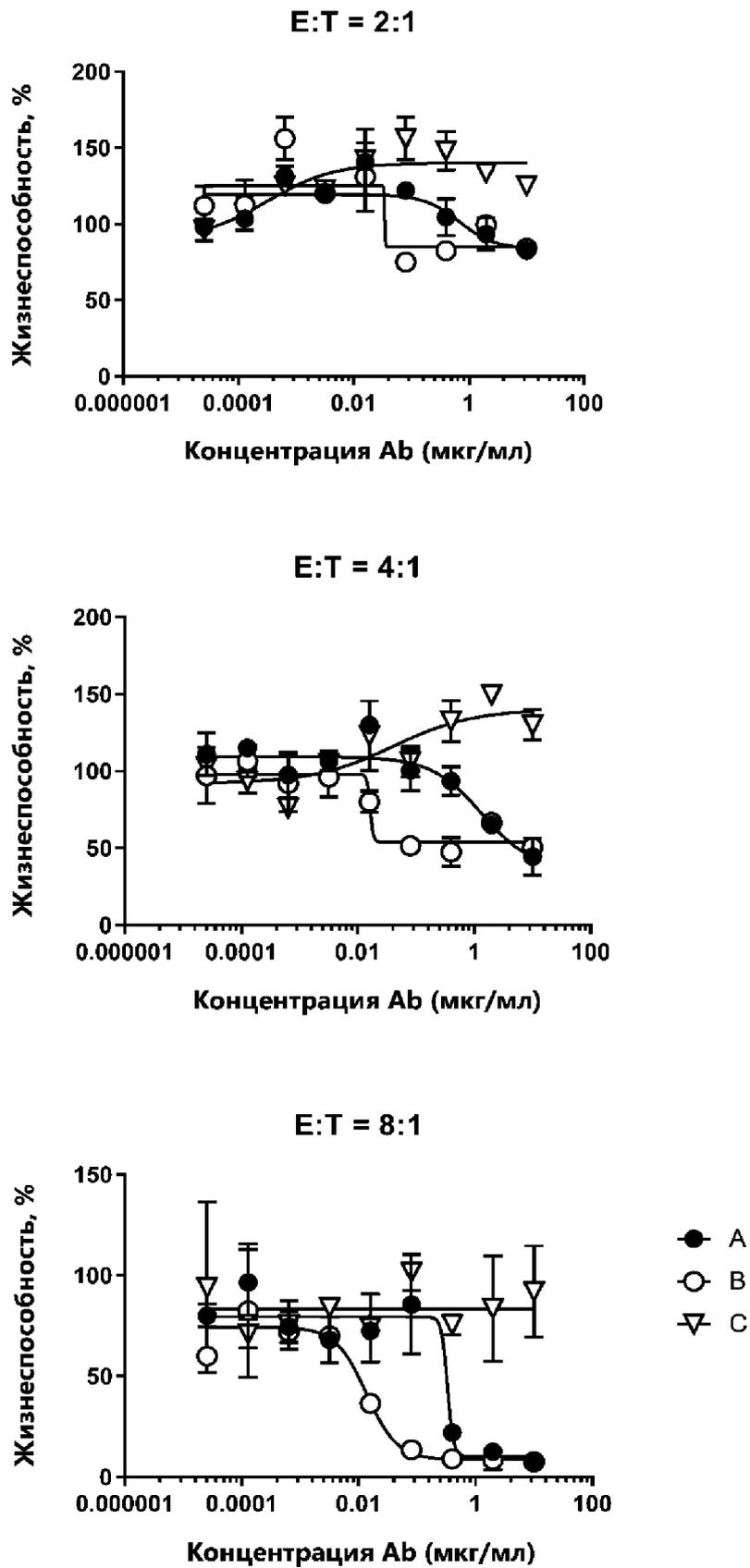
## MDA-MB-468



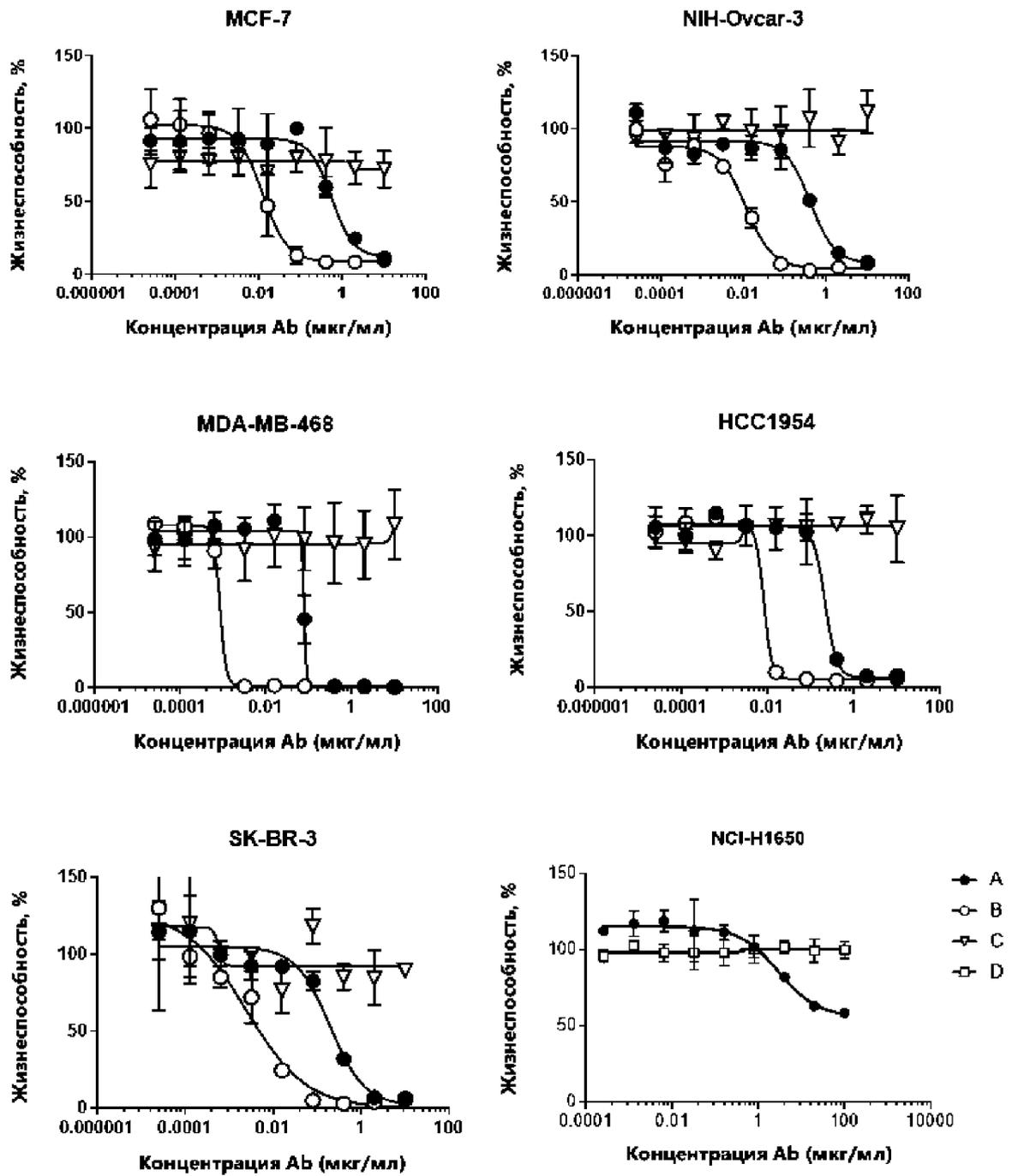
## HCC1954



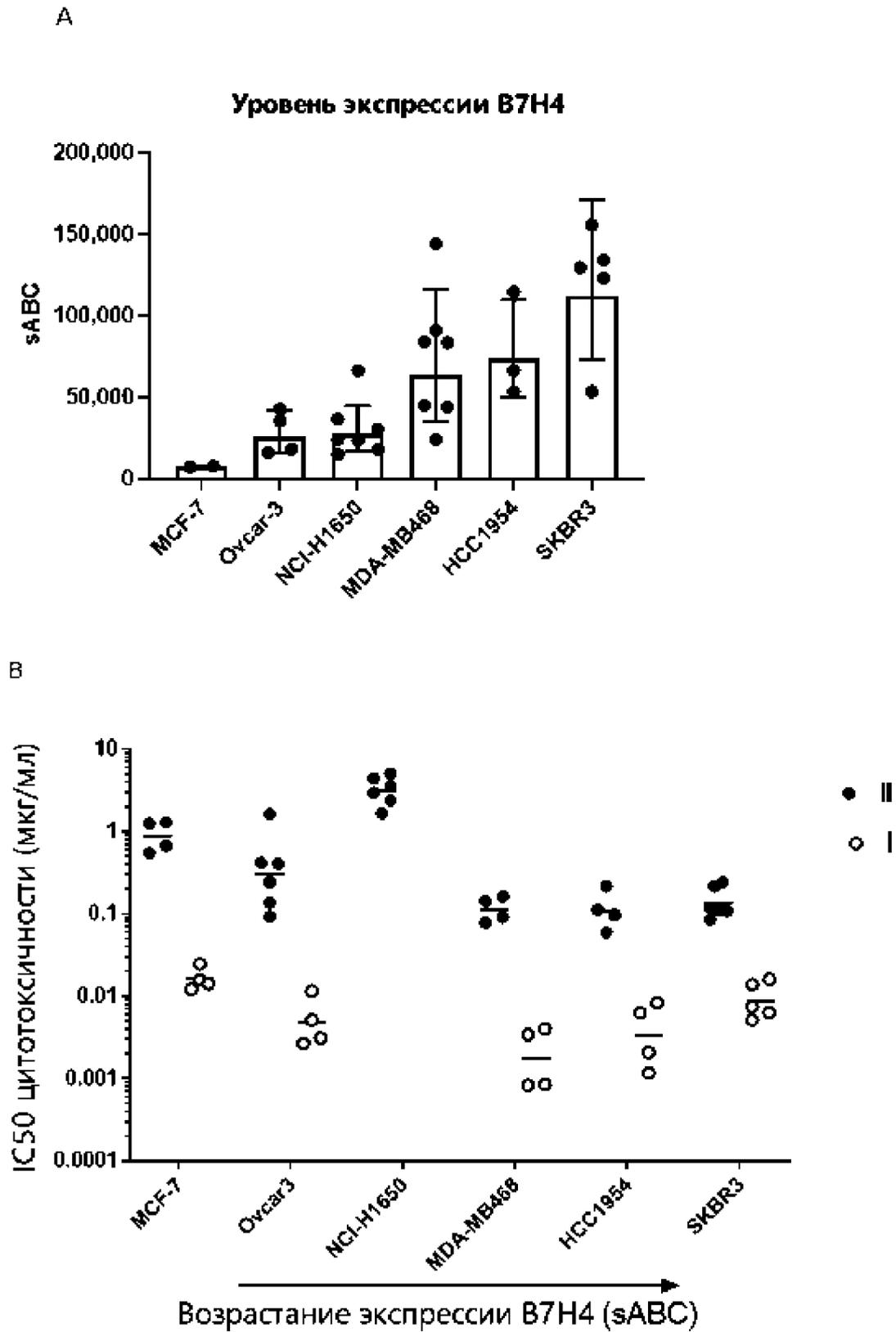
Фиг. 10



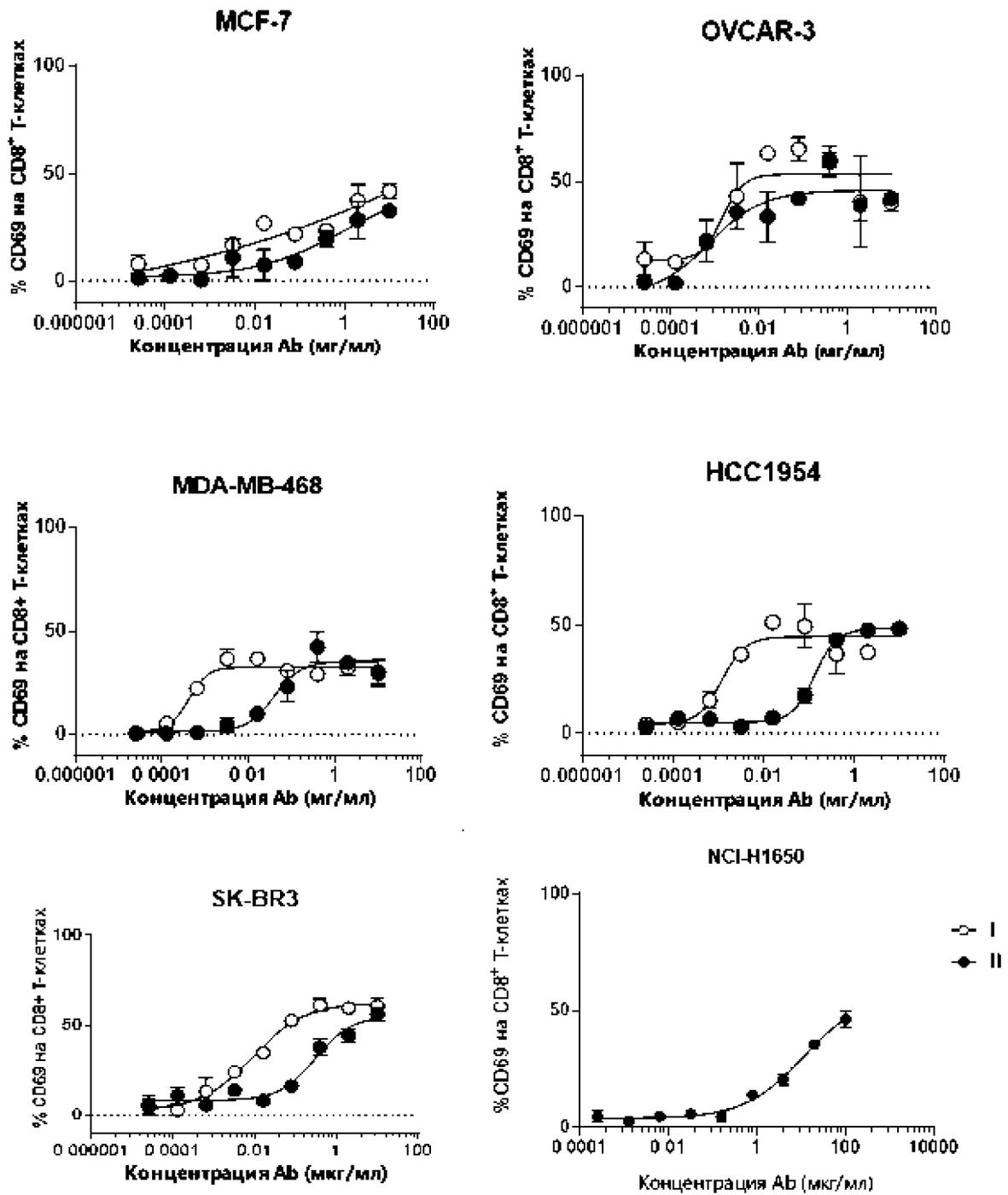
Фиг. 11



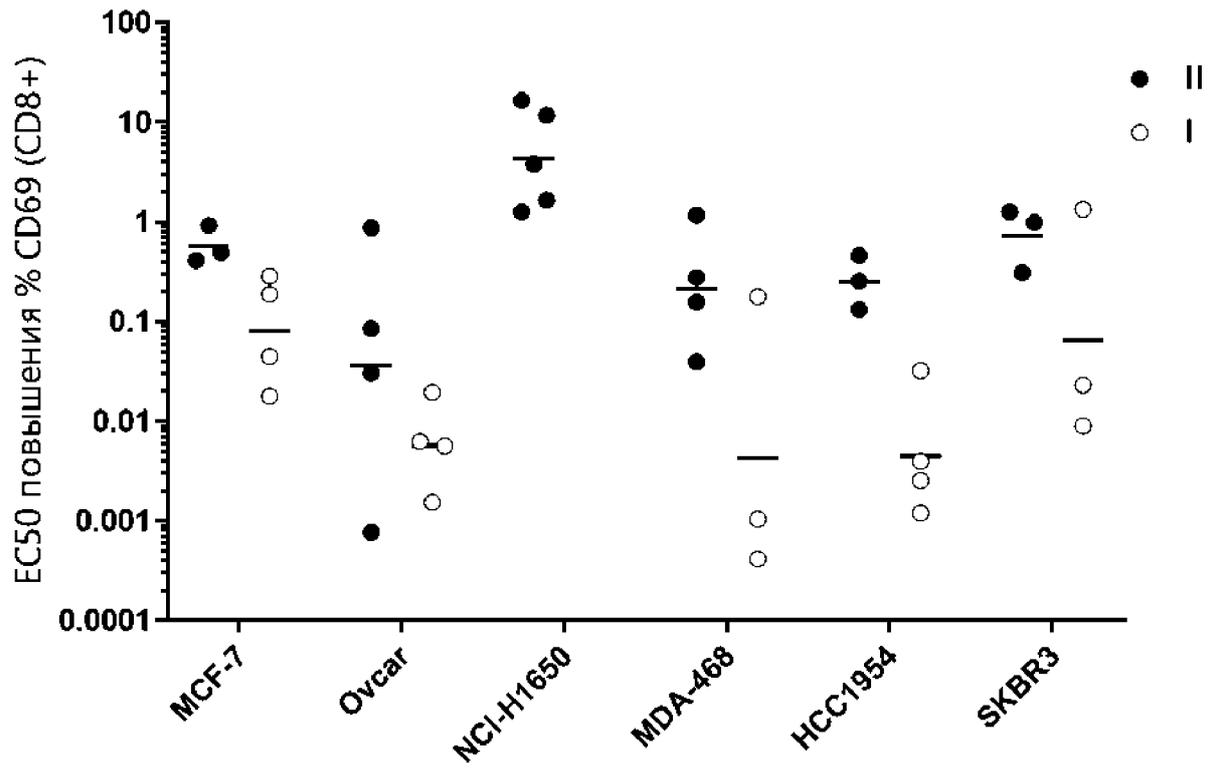
Фиг. 12



Фиг. 13

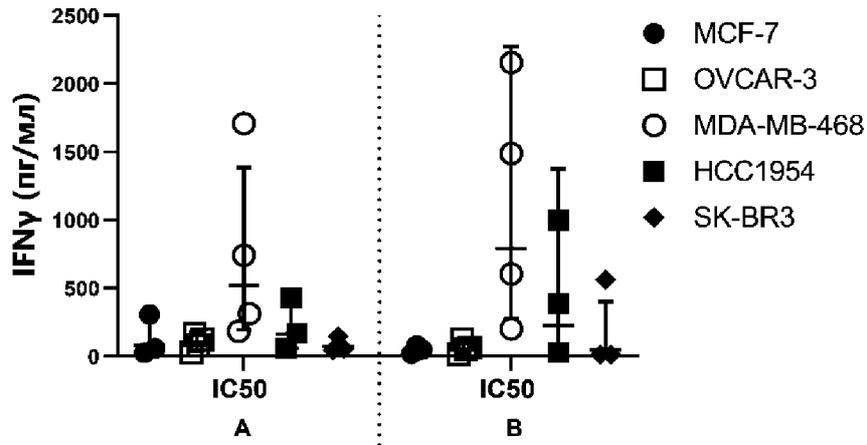
**A**

Фиг. 14

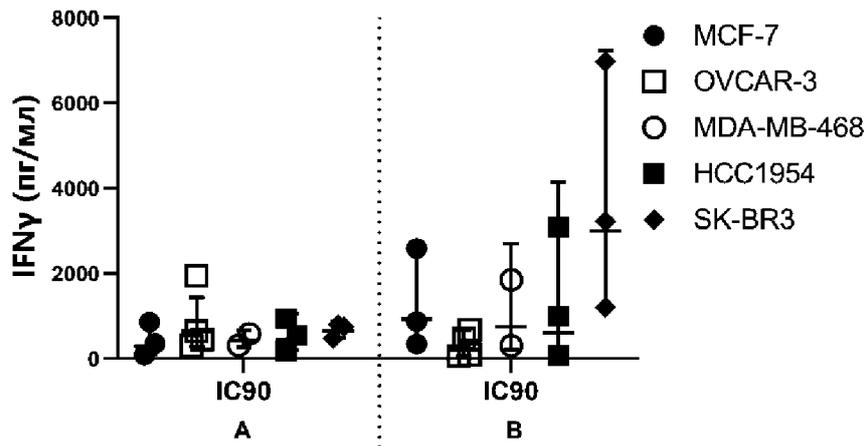


Фиг. 14 (продолжение)

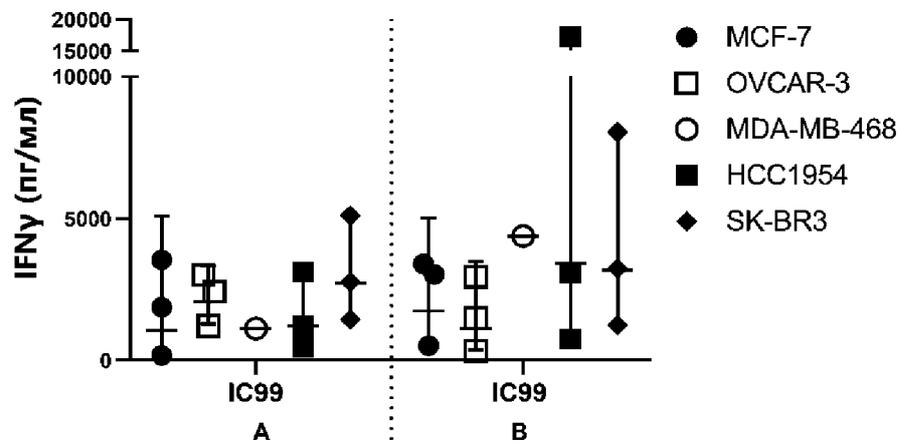
**Продукция IFN $\gamma$  при IC50 клеточной линии**



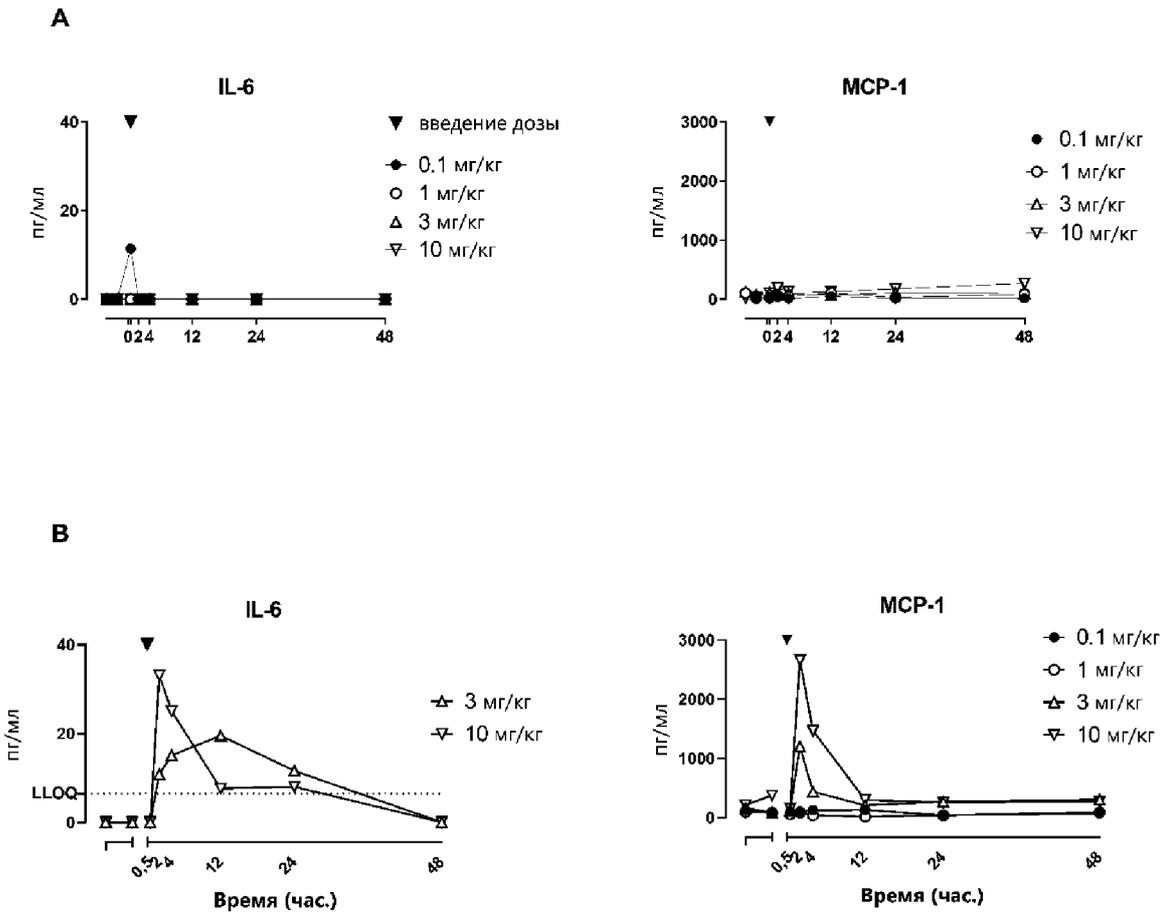
**Продукция IFN $\gamma$  при IC90 клеточной линии**



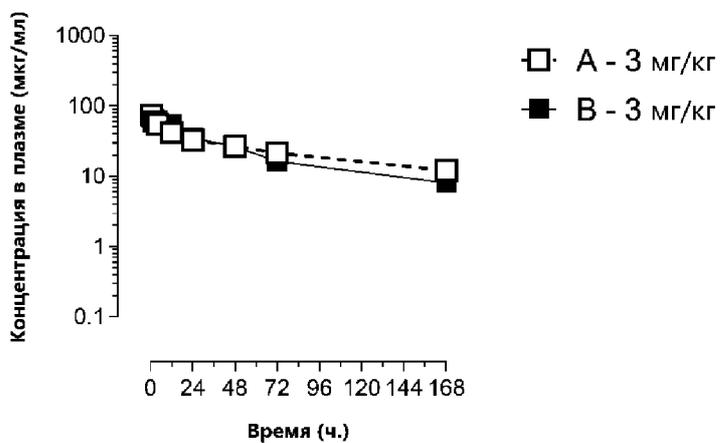
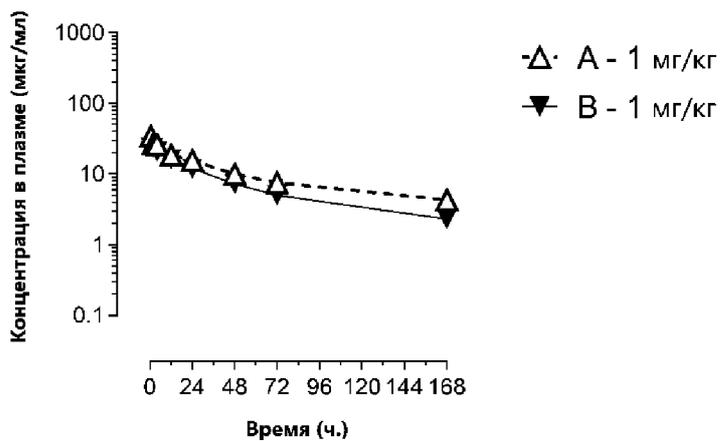
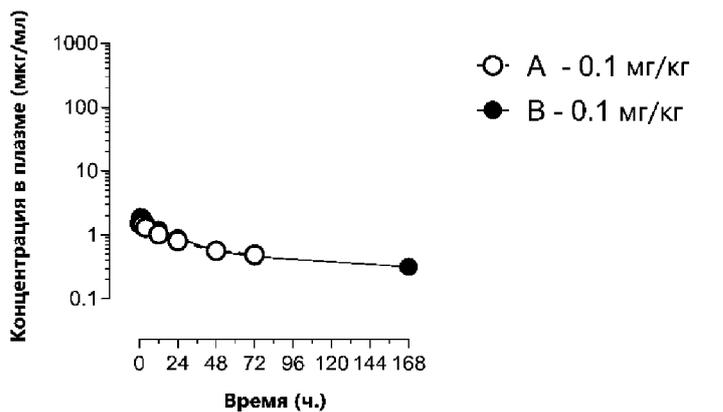
**Продукция IFN $\gamma$  при IC99 клеточной линии**



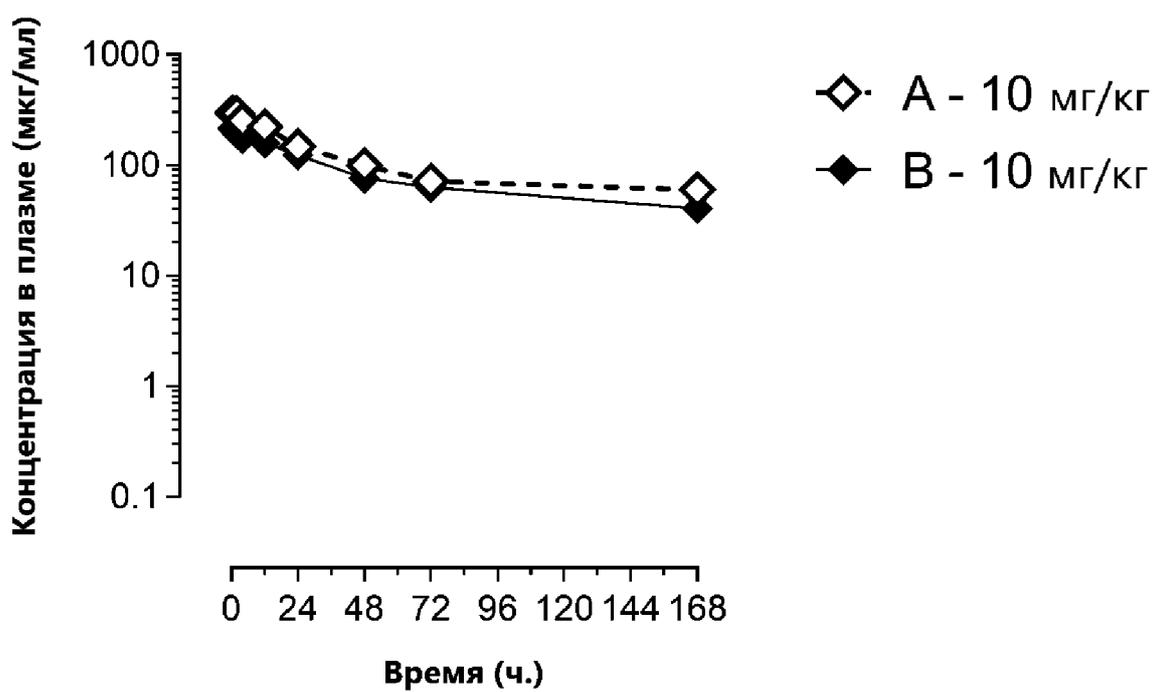
Фиг. 15



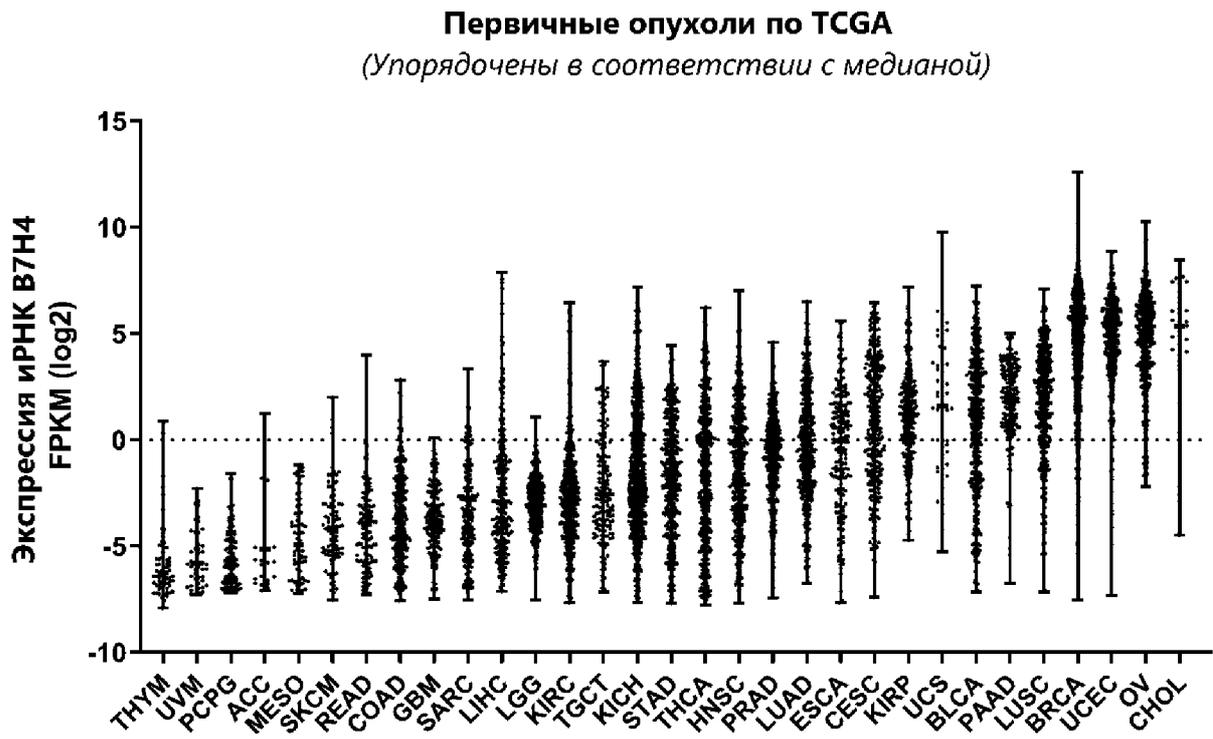
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 18