

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393093** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.02

(54) **АНТИТЕЛА К 5Т4 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/183,636**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.05.04**

Богин Орен, Дасса Лиат (IL)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/IL2022/050451**

Кузнецова С.А. (RU)

(87) **WO 2022/234570 2022.11.10**

(71) Заявитель:

ИММУНОРИЗОН ЛТД. (IL)

(57) В настоящем изобретении описан ряд антител к 5Т4. В некоторых вариантах осуществления описаны антитела к 5Т4, содержащие определенные определяющие комплементарность области (CDR). Антитела к 5Т4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения различных заболеваний, таких как рак.

A1

202393093

202393093

A1

АНТИТЕЛА К 5Т4 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ДЕКЛАРАЦИЯ ДЛЯ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия упомянутого перечня в формате ASCII, созданная 2 мая 2022 г., называется P-604133-PC_SL.txt и имеет размер 130 килобайт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится по существу к антителам. В одном варианте осуществления в настоящем описании изложено получение и варианты применения антител к 5Т4 и их фрагментов, связывающих антиген 5Т4.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Предпринимаются значительные усилия, направленные на разработку иммунотерапевтических подходов к лечению рака; многие из этих подходов зависят от нацеливания на ассоциированные с опухолью антигены (ТАА). Хотя было идентифицировано множество ТАА, не все имеют свойства, подходящие для обеспечения безопасного и эффективного иммунного нацеливания. Такие свойства включают в себя сильно ограниченный профиль экспрессии в нормальных тканях, но широкую экспрессию при многих различных типах рака. Кроме того, важным свойством для антимишеневых терапевтических средств на основе антител является экспрессия на поверхности клеток.

[0004] 5Т4, также известный как трофобластный гликопротеин, представляет собой быстро интернализуемый антиген клеточной поверхности. 5Т4 был открыт

в рамках попытки идентификации общих молекул клеточной поверхности, функция которых может быть связана с обеспечением выживаемости плода в качестве полуаллотрансплантата в организме матери или опухоли в организме-хозяине. Из препаратов мембран трофобластов родовой плаценты человека были выращены мышинные моноклональные антитела против очищенных гликопротеинов, и был проведен их первичный скрининг в отношении различных раковых клеточных линий и мононуклеарных клеток периферической крови человека.

[0005] Экспрессия 5T4, по данным иммуногистохимии, наблюдалась в различных солидных опухолях (т. е. при раке легкого, молочной железы, яичника, эндометрия, мочевого пузыря, поджелудочной железы, пищевода и желудка), причем было обнаружено, что экспрессия в нормальных взрослых тканях ограничена. Экспрессия 5T4 была связана с распространенным заболеванием и/или худшими клиническими исходами у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, колоректальным раком, раком яичника или раком желудка и острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников (BCP-ALL).

[0006] Имеется все больше доказательств того, что ключевые субпопуляции клеток, вызывающих развитие опухоли, отражают свойства обновления нормальной ткани, сохраняющиеся и задействованные для целей развития рака. Плохо дифференцированные опухоли при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC) связаны с меньшей продолжительностью жизни пациента и более коротким периодом до рецидива после лечения. С использованием множества экспериментальных моделей с клинико-патологическим анализом опухолей от пациентов для определения клеточной иерархии при NSCLC было показано, что 5T4 экспрессируется на вызывающих развитие опухоли клетках и ассоциируется с худшим клиническим исходом. Несмотря на гетерогенную экспрессию 5T4 в ксенотрансплантатах, полученных от пациентов с NSCLC, лечение конъюгатом антитело к 5T4 — лекарственное средство приводило к полной и устойчивой

регрессии опухоли. Таким образом, агрессивный рост гетерогенных солидных опухолей можно заблокировать терапевтическими агентами, которые нацелены на субпопуляцию клеток, экспрессирующих 5T4.

[0007] Было показано, что молекулы 5T4 участвуют в функциональной экспрессии CXCR4 на клеточной поверхности в некоторых эмбриональных и опухолевых клетках. Экспрессия как CXCL12, так и CXCR4 связана с онкогенезом при многих раковых заболеваниях, и считается, что экспрессия CXCR4 облегчает распространение на ткани, которые имеют высокую экспрессию CXCL12, включая легкие, печень, лимфатические узлы и костный мозг. 5T4 экспрессируется предполагаемыми иницирующими лейкоз клетками при BCP-ALL, и эти клетки демонстрируют ассоциированное с ними свойство CXCL12/CXCR4-хемотаксиса. 5T4-положительные иницирующие лейкоз клетки, вероятно, привлекаются посредством CXCL12, продуцируемого в экстрамедуллярных сайтах, где снижена биодоступность терапевтических средств, что приводит к рецидиву заболевания после лечения.

[0008] Внутриклеточная сигнализация белка Wnt является центральным компонентом многих аспектов клеточной регуляции, критически важных для нормального развития, гомеостаза и регенерации, тогда как нарушение регуляции может приводить к заболеванию, включая рак. Существует два пути, наиболее охарактеризованным из которых является канонический путь Wnt/ β -катенина, тогда как неканоническая сигнализация Wnt через клеточный автономный путь плоскостной полярности клеток (PCP) может обеспечивать модуляцию активности актинового и микротрубочкового скелетов, способствующих перемещению клеток при развитии рака. Было показано, что 5T4 нарушает сигнализацию Wnt/ β -катенина и одновременно активирует неканонические пути Wnt.

[0009] С учетом избирательного характера экспрессии 5T4 и его связи с фенотипом, иницирующим опухоли, а также механистического вовлечения в

распространение рака были разработаны несколько различных иммунотерапевтических стратегий, включающих 5T4. Вакцина 5T4, антитело к 5T4, нацеленный антителом к 5T4 суперантиген, конъюгат антитело к 5T4 — лекарственное средство и антитело к 5T4 — химерный антигенный рецептор были исследованы в отношении лечения рака в доклинических и клинических исследованиях. Хотя были получены несколько «5T4-специфических» антител против специфических пептидов или последовательностей молекулы 5T4, их эпитопы часто были не идентифицированы, и могли включать части молекулы 5T4, содержащие богатые лейцином повторы, которые используются большим количеством белков с разнообразными функциями и экспрессией. Таким образом, существует потребность в дальнейшей разработке антител к 5T4 для иммунотерапевтических применений.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен ряд антител к 5T4. В одном варианте осуществления каждое из антител к 5T4 содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

[0011] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8; или

[0012] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16; или

[0013] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24; или

[0014] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32; или

[0015] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40; или

[0016] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48; или

[0017] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56; или

[0018] HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

[0019] В одном варианте осуществления каждое из антител к 5T4 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи могут представлять собой одну из следующих пар: SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76; SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86;

SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102; SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID NO: 125–126; SEQ ID NO: 127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152.

[0020] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложена композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и антитело к 5Т4, описанные в настоящем документе.

[0021] В настоящем описании также предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к 5Т4, описанные в настоящем документе, а также векторы и клетки-хозяева, содержащие такие полинуклеотидные последовательности.

[0022] В одном варианте осуществления антитела к 5Т4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, таких как рак, аутоиммунные заболевания, реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD), вирусная инфекция или бактериальная инфекция.

[0023] Эти и другие аспекты антител к 5Т4 будут понятны из последующих описаний фигур и подробного описания антител к 5Т4.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] Некоторые варианты осуществления антител к 5Т4 и варианты их применения описаны в настоящем документе только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы. В контексте деталей

графических материалов следует подчеркнуть, что представленные детали приведены в качестве примера и в целях иллюстративного пояснения вариантов осуществления антител к 5Т4 и вариантов их применения. Таким образом, при изучении описания в комбинации с графическими материалами специалистам в данной области становится очевидно, как можно реализовать на практике варианты осуществления антител к 5Т4 и вариантов их применения.

[0025] На **Фиг. 1А–1D** показано связывание рекомбинантного белка 5Т4 ECD человека, слитого с Fc человека, с использованием твердофазного ИФА (**Фиг. 1А–1В**) и цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) (**Фиг. 1С–1D**). На **Фиг. 1А–1В** показано связывание сыворотки с рекомбинантным белком 5Т4 ECD человека, слитого с Fc человека, с помощью твердофазного ИФА после подкожной (п/к) иммунизации (**Фиг. 1А**) или внутривенной (в/в) иммунизации (**Фиг. 1В**). На **Фиг. 1С–1D** показано связывание сыворотки с клетками яичника китайского хомячка (СНО), сверхэкспрессирующими 5Т4, по данным FACS (**Фиг. 1С**) или с родительскими клетками СНО (**Фиг. 1D**). ТВ2 — тестовый забор крови 2. Указаны справочные номера разных мышей. hIgG1 — отрицательный контроль связывания. Антитело к ТРВГ (антитело к трофобластному гликопротеину) используют в качестве положительного контроля.

[0026] На **Фиг. 2** показана таблица идентификаторов выбранных клонов гибридомы мыши.

[0027] На **Фиг. 3А–3В** показан ДСН-ПААГ-электрофорез очищенных клонов мАт в восстанавливающих условиях.

[0028] На **Фиг. 4А–Р** показан анализ ЭХР-ВЭЖХ репрезентативных очищенных клонов мАт 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18 и 19.

[0029] На **Фиг. 5А–5D** показаны кривые связывания по данным твердофазного ИФА для репрезентативных очищенных клонов мАт.

[0030] На **Фиг. 6А–6Н** показано связывание по данным FACS репрезентативных очищенных клонов мАт с клетками СНО, сверхэкспрессирующими 5Т4 человека (**Фиг. 6А–6С**), с клетками СНО, сверхэкспрессирующим 5Т4 яванского макака (**Фиг. 6D–6F**), и с клеточной линией рака молочной железы MCF-7 (**Фиг. 6G–6H**). Tab представляет собой антитело положительного контроля. mIgG (мышинный IgG) представляет собой IgG мыши отрицательного контроля. hIgG (IgG человека) представляет собой IgG человека отрицательного контроля. Антитело к 5Т4 представляет собой антитело hIgG положительного контроля.

[0031] На **Фиг. 7А–7G** показан Octet-анализ выбранного очищенного мАт, причем на **Фиг. 7А–7F** показаны данные анализа тестирования Octet для репрезентативных клонов мАт, а на **Фиг. 7G** представлена сводка ранжированных значений константы диссоциации (KD).

[0032] На **Фиг. 8** показан анализ группировки по эпитопам, выполненный с помощью твердофазного ИФА, выявивший три основных группы, отличающихся по эпитопу. Группа 1 (круг, непрерывная линия), группа 2 (квадрат, пунктирная линия) и группа 3 (круг, пунктирная линия).

[0033] На **Фиг. 9А–9С** показано связывание некоторых вариантов осуществления очищенных химерных мАт к 5Т4 по данным твердофазного ИФА (**Фиг. 9А**), по данным FACS с клетками СНО (**Фиг. 9В**) и по данным FACS с клетками MCF-7 (**Фиг. 9С**). Tab представляет собой антитело положительного контроля. hIgG представляет собой IgG человека отрицательного контроля.

[0034] На **Фиг. 10А–10В** показан вариант осуществления структуры Tribody (**Фиг. 10А**) и вариант осуществления структуры ProTribody (**Фиг. 10В**). VL — переменная область легкой цепи Fab антитела к CD3, VH — переменная область тяжелой цепи Fab антитела к CD3, HSA — человеческий сывороточный альбумин, анти-НК — антитело к антигену натуральных киллерных клеток, анти-ТАА — антитело к опухолеассоциированному антигену. CD3CAP — маскирующий фрагмент, который блокирует связывание антитела к CD3 с

антигеном CD3. Линкеры (с протеазным расщеплением или без него), показанные в этих двух вариантах осуществления, могут быть одинаковыми или разными, или в некоторых вариантах осуществления могут отсутствовать в любом заданном положении.

[0035] На **Фиг. 11** показаны варианты осуществления экспрессируемых антительных конструкторов Tribody, проанализированных с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. См. **табл. 1**, где приведены SEQ ID NO для каждого конструктора. R — в восстанавливающих условиях. NR — в невосстанавливающих условиях.

[0036] На **Фиг. 12А–12В** показан ДСН-ПААГ-электрофорез (**Фиг. 12А**) и ЭХР-ВЭЖХ анализ (**Фиг. 12В**) антительного конструктора Tribody (IM-1222), включающего в себя связывающий домен антитела к 5Т4 (5Т4_IM53).

[0037] На **Фиг. 13А–13В** показан МС-анализ конструктора Tribody (IM-1222), включающего в себя связывающий домен антитела к 5Т4 (5Т4_IM53), в восстанавливающих условиях (**Фиг. 13А**) и интактного (**Фиг. 13В**).

[0038] На **Фиг. 14А–14В** показан ДСН-ПААГ-электрофорез (**Фиг. 14А**) и ЭХР-ВЭЖХ анализ (**Фиг. 14В**) антительного конструктора Tribody (IM-1178), включающего в себя связывающий домен антитела к 5Т4 (5Т4_IM24).

[0039] На **Фиг. 15А–15В** показан МС-анализ конструктора Tribody, включающего в себя связывающий домен антитела к 5Т4 (5Т4_IM24), в восстанавливающих условиях (**Фиг. 15А**) и интактного (**Фиг. 15В**).

[0040] На **Фиг. 16А–16Н** показаны результаты скрининга с помощью твердофазного ИФА на связывание различных вариантов осуществления очищенных гуманизированных антительных конструкторов Tribody, содержащих различные связывающие домены антитела к 5Т4.

[0041] На **Фиг. 17А–17О** показан скрининг с помощью FACS на связывание очищенных гуманизированных конструкторов Tribody, содержащих различные связывающие домены антитела к 5Т4, с клетками СНО, сверхэкспрессирующими

человеческий 5Т4 (Фиг. 17А–17Н), или с клеточной линией рака легкого NCI-H226 (Фиг. 17I–17O).

[0042] На Фиг. 18А и 18В показана цитотоксичность *in vitro*, опосредованная различными вариантами осуществления гуманизованных конструкторов Tribody в отношении клеток рака легкого NCI-H226 (Фиг. 18А) и клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Фиг. 18В). Конструктор Tribody IM1222 содержит связывающий домен антитела к 5Т4 5Т4_IM53. Конструктор Tribody IM1062 содержит связывающий домен антитела к 5Т4 положительного контроля, а конструктор TriBody IM1184 представляет собой связывающий домен антитела к 5Т4 положительного контроля с фрагментом CD3 CAP.

[0043] На Фиг. 19 показана эффективность *in vivo* конструктора Tribody в отношении ксенотрансплантата на мышинной модели. Каждый из конструкторов Tribody содержит один связывающийся с 5Т4 домен.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0044] В настоящем описании представлены выделенные антитела к 5Т4, в которых уникальные последовательности CDR из мАт к 5Т4 обеспечены в гуманизованном каркасе (химерное антитело; гуманизованное антитело). Кроме того, продемонстрировано включение антигенсвязывающих областей 5Т4 этих антител к 5Т4 в мультивалентный антительный конструктор. Антитела к 5Т4, описанные в настоящем документе, потенциально могут быть использованы в качестве иммунотерапевтического лечения медицинского состояния, например рака.

[0045] Используемый в настоящем документе термин «антитело» может использоваться взаимозаменяемо с термином «иммуноглобулин», имеющим такие же качества и значения. Связывающий домен антитела или антигенсвязывающий сайт может представлять собой фрагмент антитела или

генетически сконструированный продукт из одного или более фрагментов антитела, причем фрагмент участвует в специфическом связывании с антигеном-мишенью. Под «специфическим связыванием» понимается, что связывание является избирательным по отношению к интересующему антигену и может быть дискриминировано от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Например, говорят, что антитело специфически связывается с эпитопом 5T4, когда равновесная константа диссоциации составляет $\leq 10^{-5}$, 10^{-6} или 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может составлять $\leq 10^{-8}$ М или 10^{-9} М. В некоторых дополнительных вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может составлять $\leq 10^{-10}$ М, 10^{-11} М или 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации может находиться в диапазоне от $\leq 10^{-5}$ М до 10^{-12} М.

[0046] «Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50})» означает концентрацию лекарственного средства, антитела или токсического вещества, вызывающую ответ, выраженность которого находится посередине между исходным и максимальным уровнями после указанного времени воздействия. В некоторых вариантах осуществления ответ включает аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления ответ включает функциональный ответ, например агонистический ответ. Специалисту в данной области будет понятно, что при использовании в настоящем документе в определенных вариантах осуществления измерение EC_{50} для антитела к 5T4, описанного в настоящем документе, обеспечивает меру полумаксимального связывания антитела к 5T4 с антигеном 5T4 (EC_{50} для связывания). Специалисту в данной области будет понятно, что в настоящем документе в определенных вариантах осуществления измерение EC_{50} для антитела к 5T4, описанного в настоящем документе, обеспечивает меру полумаксимальной эффективной концентрации антитела к 5T4 для индукции агонистического ответа (EC_{50} для функционального агонизма).

[0047] В некоторых вариантах осуществления термин EC_{50} включает концентрацию антитела, необходимую для получения 50% агонистического ответа, который будет наблюдаться при связывании с антителом. В определенных вариантах осуществления показатель EC_{50} обычно используют в качестве показателя активности лекарственного средства, и он может в некоторых вариантах осуществления отражать связывание антитела с рецептором. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, имеющие наномолярные показатели EC_{50} для концентрации связывания, относятся к прочно связывающимся антителам к 5T4. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, имеющие наномолярные показатели EC_{50} для функционального агонизма, относятся к функционально эффективным агонистическим антителам. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4, описанное в настоящем документе, содержит вещество, прочно связывающееся с молекулой 5T4. В определенных вариантах осуществления антитело к 5T4, описанное в настоящем документе, представляет собой агонист молекулы 5T4. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4, описанное в настоящем документе, представляет собой агонист, прочно связывающийся с молекулой 5T4.

[0048] В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в наномолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–50 нМ. В некоторых вариантах

для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 5–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,01–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} для связывания антитела к 5T4 находится в диапазоне около 1–15 нМ.

[0050] В некоторых вариантах осуществления значение EC_{50} , измеряющее функциональный агонизм, в настоящем документе называется функциональным EC_{50} , и этот термин имеет все те же качества. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в наномолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,05–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–100 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–50 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–20 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5T4 находится в диапазоне около 0,1–10 нМ.

вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5Т4 находится в диапазоне около 1–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5Т4 находится в диапазоне около 5–10 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5Т4 находится в диапазоне около 0,05–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5Т4 находится в диапазоне около 0,01–15 нМ. В некоторых вариантах осуществления функциональный EC_{50} для антитела к 5Т4 находится в диапазоне около 1–15 нМ.

[0052] Используемый в настоящем документе термин «антитело» охватывает фрагмент или фрагменты антитела, которые сохраняют специфичность связывания, включая, без ограничений, IgG, переменную область тяжелой цепи (VH), переменную область легкой цепи (VL), антигенсвязывающие фрагменты (Fab фрагменты), F(ab')₂ фрагменты, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv фрагменты), переменные фрагменты (Fv фрагменты), нанотело, минитело, диатело, триатело, тетратело и однодоменные антитела (см., например, Hudson and Souriau, Nature Med. 9 : 129-134 (2003)). Также сюда входят гуманизированные, приматизированные и химерные антитела в значении, обычно понимаемом в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит конструктор-предшественник, в котором антигенсвязывающий сайт может быть заблокирован регуляторным доменом, причем воздействие связывающего сайта включает регулируемое воздействие в зависимости от условий окружения, например, без ограничений, воздействие микроокружения опухоли.

[0053] Используемый в настоящем документе термин «переменная область тяжелой цепи» может использоваться взаимозаменяемо с термином «домен VH» или термином «VH», имеющим все те же значения и качества. Используемый в настоящем документе термин «переменная область легкой цепи» может использоваться взаимозаменяемо с термином «домен VL» или термином «VL»,

имеющим все те же значения и качества. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «вариабельная область тяжелой цепи» или «VH» применительно к антителу охватывает фрагмент тяжелой цепи, который содержит три определяющих комплементарность области (CDR), расположенные между фланкирующими участками, называемыми каркасными областями. Каркасные области являются более высококонсервативными, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR. Аналогично, специалисту в данной области также будет понятно, что термин «вариабельная область легкой цепи» или «VL» применительно к антителу охватывает фрагмент легкой цепи, который содержит три CDR, расположенные между каркасными областями.

[0054] Используемый в настоящем документе термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к гипервариабельной (-ым) области (-ям) в вариабельной области тяжелой или легкой цепи. Начиная от N-конца, каждый из полипептидов тяжелой или легкой цепи имеет три CDR, обозначенные «CDR1», «CDR2» и «CDR3». Кристаллографический анализ ряда комплексов антиген-антитело продемонстрировал, что аминокислотные остатки CDR образуют обширный контакт со связанным антигеном. Таким образом, области CDR в первую очередь отвечают за специфичность антигенсвязывающего сайта. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий сайт включает в себя шесть CDR, содержащих CDR из каждой вариабельной области тяжелой и легкой цепей.

[0055] Используемый в настоящем документе термин «каркасная область» или «FR» относится к четырем фланкирующим аминокислотным последовательностям, которые окружают CDR вариабельной области тяжелой или легкой цепи. Некоторые остатки FR могут контактировать со связанным антигеном; однако остатки FR в основном отвечают за складывание вариабельной области в антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления остатки FR, ответственные за складывание вариабельных областей, содержат

остатки, непосредственно прилегающие к CDR. В пределах FR определенные аминокислотные остатки и определенные структурные особенности имеют очень высокую консервативность. В этом отношении все последовательности переменных областей содержат внутреннюю дисульфидную петлю из около 90 аминокислотных остатков. Когда переменная область складывается в антигенсвязывающий сайт, CDR открываются как выступающие петли-мотивы, которые образуют антигенсвязывающую поверхность. Общеизвестно, что существуют консервативные структурные области FR, которые влияют на форму петель CDR, сложенную в определенные «канонические» структуры, независимо от точной аминокислотной последовательности CDR. Кроме того, известно, что определенные остатки FR участвуют в нековалентных межмолекулярных контактах, которые стабилизируют взаимодействие тяжелой и легкой цепей антитела.

[0056] Антитело может существовать в различных формах или иметь различные домены, включая, без ограничений, определяющую комплементарность область (CDR), переменную область (Fv), домен VH, домен VL, одноцепочечную переменную область (scFv) и Fab фрагмент.

[0057] Специалисту в данной области будет понятно, что scFv представляет собой слитный полипептид, содержащий переменные области тяжелой цепи (VH) и легкой цепи иммуноглобулина, соединенные коротким линкерным пептидом. Линкер может иметь длину, например, от 10 до около 25 аминокислот.

[0058] Специалисту в данной области также будет понятно, что термин «Fab» в отношении антитела по существу охватывает часть антитела, состоящую из одной легкой цепи (как с переменной, так и с константной областями), связанной с переменной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью, тогда как «F(ab')₂» содержит фрагмент тяжелой цепи, содержащий домен VH, и легкую цепь, содержащую домен VL.

[0059] В некоторых вариантах осуществления «антитело» охватывает молекулы полных антител, включая моноклональные и поликлональные антитела. В

некоторых вариантах осуществления «антитело» охватывает фрагмент или фрагменты антитела, которые сохраняют специфичность связывания, включая, без ограничений, фрагменты вариабельной области тяжелой цепи (VH), фрагменты вариабельной области легкой цепи (VL), Fab-фрагменты, F(ab')₂ фрагменты, scFv фрагменты, Fv фрагменты, минитела, диатела, триатела и тетратела.

[0060] В одном варианте осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут входить в состав биспецифического антитела. В одном варианте осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут входить в состав мультиспецифического антитела. Как общеизвестно в данной области, биспецифическое антитело представляет собой рекомбинантный белок, который включает в себя антигенсвязывающие фрагменты двух разных моноклональных антител и, таким образом, способен связывать два разных антигена. В одном варианте осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут входить в состав триспецифического антитела. В одном варианте осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут входить в состав мультиспецифического антитела. Аналогичным образом мультиспецифическое антитело представляет собой рекомбинантный белок, который включает в себя антигенсвязывающие фрагменты по меньшей мере двух разных моноклональных антител, например двух, трех или четырех разных моноклональных антител.

[0061] В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, являются двухвалентными для 5T4. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, являются моновалентными для связывания 5T5.

[0062] В некоторых вариантах осуществления биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела используют для иммунотерапии рака путем одновременного нацеливания на более чем одну

мишень-антиген, например, без ограничений, на цитотоксическую Т-клетку (CTL), а также на ассоциированный с опухолью антиген (ТАА), или для одновременного нацеливания на более чем одну CTL, например на компонент рецептора CTL, такой как CD3, эффекторные натуральные киллерные клетки (NK) и ассоциированный с опухолью антиген (ТАА), причем, например, ТАА содержит 5Т4.

Антитела к 5Т4

[0063] В настоящем описании предложен ряд антител к 5Т4. В одном варианте осуществления каждое из антител к 5Т4 содержит набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и набор из трех CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[0064] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8.

[0065] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16.

[0066] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24.

[0067] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32.

[0068] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40.

[0069] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48.

[0070] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56.

[0071] В одном варианте осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

[0072] В одном варианте осуществления выделенное антитело к 5Т4, содержащее три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), представляет собой антитело, в котором

- (i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8; или
- (ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16; или
- (iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24; или
- (iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32; или
- (v) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40; или

- (vi) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48; или
- (vii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56; или
- (viii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

[0073] В другом варианте осуществления антитела к 5Т4 содержат последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0074] В одном варианте осуществления каждое из антител к 5Т4, представленных в настоящем документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи могут представлять собой одну из следующих пар: SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76; SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86; SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102; SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID NO: 125–126; SEQ ID NO:

127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152. В другом варианте осуществления антитела к 5T4 содержат последовательности VH и VL, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0075] В одном варианте осуществления с учетом последовательностей переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко использовать стандартные методики, известные в данной области, для конструирования scFv к 5T4.

[0076] В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предложены полипептиды, содержащие домены VH и VL, которые могут быть димеризованы в подходящих условиях. Например, домены VH и VL могут быть объединены в подходящем буфере и димеризованы посредством соответствующих взаимодействий, таких как гидрофобные взаимодействия. В другом варианте осуществления домены VH и VL могут быть объединены в подходящем буфере, содержащем фермент и/или кофактор, который может способствовать димеризации доменов VH и VL. В другом варианте осуществления домены VH и VL могут быть объединены в подходящем носителе, который позволяет им взаимодействовать друг с другом в присутствии подходящего реагента и/или катализатора.

[0077] В определенных вариантах осуществления домены VH и VL могут содержаться в более длинных полипептидных последовательностях, которые могут включать, например, без ограничений, константные области, шарнирные области, линкерные области, области Fc или области дисульфидных связей или любую их комбинацию. Константный домен представляет собой блок

складывания иммуноглобулина в константной части молекулы иммуноглобулина, также называемый доменом константной области (например, CH1, CH2, CH3, CH4, Cκ, Cλ). В некоторых вариантах осуществления более длинные полипептиды могут содержать несколько копий одного или обоих доменов VH и VL, сгенерированных в соответствии со способом, описанным в настоящем документе; например, когда полипептиды, сгенерированные как описано в настоящем документе, используют для формирования диатела или триатела.

[0078] В одном варианте осуществления антитело к 5T4, представленное в настоящем документе, может представлять собой IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, минитело, диатело, триатело, нанотело, биспецифическое антитело, триспецифическое, мультиспецифическое или однодоменное антитело. Например, антитело к 5T4 может представлять собой IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4 содержит IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4 содержит IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4 содержит IgG3. В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4 содержит IgG4.

[0079] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложены антитела, которые связываются с 5T4 с высокой аффинностью. В одном варианте осуществления аффинность связывания рассчитывают с помощью модификации метода Скэтчарда, описанной в публикации Frankel et al. (Mol. Immunol., 16:101-106, 1979). В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют по скорости диссоциации комплекса антиген/антитело. В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют с помощью конкурентного радиоиммунологического анализа. В другом варианте осуществления аффинность связывания измеряют с помощью твердофазного ИФА. В другом варианте осуществления аффинность антитела измеряют с помощью проточной цитометрии.

[0080] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложен вектор, содержащий такие полинуклеотидные последовательности. С учетом аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко создать вектор или плазмиду, кодирующую аминокислотные последовательности. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе. В зависимости от способа применения и экспериментальных условий, специалист в данной области сможет легко использовать подходящую клетку-хозяина для носительства и/или экспрессии вышеупомянутых полинуклеотидных последовательностей.

[0081] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложен вектор, содержащий такие полинуклеотидные последовательности. С учетом аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, специалист в данной области сможет легко создать вектор или плазмиду, кодирующую аминокислотные последовательности. В другом варианте осуществления в настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе. В зависимости от способа применения и экспериментальных условий, специалист в данной области сможет легко использовать подходящую клетку-хозяина для носительства и/или экспрессии вышеупомянутых полинуклеотидных последовательностей.

Композиции для применения

[0082] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложена композиция, содержащая антитело к 5Т4, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для применения, хорошо известны в данной области. Например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки антител, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к 5Т4, которые содержат набор из трех определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и набор из трех CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[0083] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8.

[0084] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16.

[0085] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24.

[0086] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32.

[0087] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40.

[0088] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48.

[0089] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56.

[0090] В некоторых вариантах осуществления композиций, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

[0091] В других вариантах осуществления композиция содержит антитела к 5T4, которые имеют последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0092] В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, имеющие одну из следующих пар из варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи: SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76;

SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86; SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102; SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID NO: 125–126; SEQ ID NO: 127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, которые имеют последовательности VH и VL, которые на по меньшей мере 80% (например, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным выше.

[0093] В некоторых вариантах осуществления композиций антитела, описанные в настоящем документе, могут иметь форму конъюгата. Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» представляет собой антитело или фрагмент антитела (такой как антигенсвязывающий фрагмент), который ковалентно связан с эффекторной молекулой или вторым белком (например, вторым антителом). Эффекторная молекула может представлять собой, например, лекарственное средство, токсин, терапевтический агент, детектируемую метку, белок, нуклеиновую кислоту, липид, наночастицу, углевод или рекомбинантный вирус. Конъюгат антитела также может называться «иммуноконъюгат». Когда конъюгат содержит антитело, связанное с лекарственным средством (например, цитотоксическим агентом), конъюгат может называться «конъюгатом антитело-лекарственное средство». Другие конъюгаты антител включают в себя, например, мультиспецифические (такие как биспецифические или триспецифические) антитела и химерные антигенные рецепторы (CAR).

[0094] Композиция, содержащая антитело к 5T4 или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть введена субъекту (например, человеку или животному) отдельно или в комбинации с носителем, т. е. фармацевтически приемлемым носителем. Под «фармацевтически приемлемым» понимают материал, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т. е. такой материал может быть введен субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов или разрушительного по своей сути взаимодействия с любым из других компонентов фармацевтической композиции, в которой он содержится. Как хорошо известно специалистам в данной области, носитель выбирают так, чтобы свести к минимуму любое разложение полипептидов, описанных в настоящем документе, и свести к минимуму любые неблагоприятные побочные эффекты у субъекта. Фармацевтические композиции могут быть получены с помощью методики, хорошо известной в фармацевтической области.

[0095] Фармацевтические композиции, содержащие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно вводить (например, млекопитающему, в клетку или ткань) любым подходящим способом в зависимости от того, требуется местное или системное лечение. Например, композицию можно вводить местно (например, офтальмологически, вагинально, ректально, интраназально, трансдермально и т. п.), перорально, путем ингаляции или парентерально (включая внутривенную капельницу или подкожную, внутрибрюшинную, внутрисполостную, внутрикожную или внутримышечную инъекцию). Местным интраназальным введением называется доставка композиций в нос и носовые проходы через одну или обе ноздри. Композиция может быть доставлена с помощью распылительного механизма или капельного механизма или путем аэрозолизации. Альтернативно, введение может быть внутриопухолевым, например местной или внутривенной инъекцией.

[0096] Если композиция должна быть введена парентерально, введение обычно осуществляют путем инъекции. Инъекционные препараты могут быть получены в обычных формах либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Кроме того, парентеральное введение может включать подготовку системы медленного высвобождения или пролонгированного высвобождения для поддержания постоянной дозировки.

Способы применения

[0097] В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний, таких как рак. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве компонента вакцины. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве составляющей конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). В некоторых вариантах осуществления антитело к 5T4, описанное в настоящем документе, может быть использовано в способах лечения рака, например, без ограничений, для лечения немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), рака молочной железы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака почек, рака предстательной железы, рака яичника или рака толстой кишки.

[0098] В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболевания, связанного с 5T4. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией 5T4.

[0099] В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, обладают цитотоксической активностью. В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, являются цитотоксическими для раковых или опухолевых клеток.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитела к 5T4, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способе терапии рака или опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой солидный рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой несолидный (диффузный) рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль представляет собой метастаз рака или опухоли.

[0101] В настоящем документе термин «способ» относится к способам, средствам, методикам и процедурам для выполнения заданной задачи, включая, без ограничений, способы, средства, методики и процедуры, известные либо поддающиеся разработке на основе известных способов, средств, методик и процедур практикующими химиками, фармакологами, биологами, биохимиками и медицинскими специалистами.

[0102] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» или «терапия» (а также их различные формы) означают терапевтическое лечение, включая профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения, связанного с заболеванием или состоянием. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничений, ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания или состояния, стабилизацию заболевания или состояния (т. е. когда заболевание или состояние не усугубляется), задержку или замедление прогрессирования заболевания или состояния, облегчение или временное облегчение заболевания или состояния и ремиссию (частичную или полную) заболевания или состояния,

поддающиеся или не поддающиеся выявлению. Требуемые лечения пациенты включают тех, кто уже имеет заболевание или состояние, а также тех, кто имеет предрасположенность к развитию заболевания или состояния, или тех, у кого такое заболевание или состояние необходимо предотвратить.

[0103] Термины «субъект», «индивидуум» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к человеку или животным, не являющимся человеком, которым проводится лечение композицией или составом с антителами к 5T4 в соответствии с настоящим описанием. Термины «не являющиеся человеком животные» и «не являющиеся человеком млекопитающие» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и включают в себя всех позвоночных, например млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы (в частности, высшие приматы), овцы, собаки, грызуны (например, мышь или крыса), морские свинки, козы, свиньи, кошки, кролики, коровы, лошади, и не относящихся к млекопитающим животных, таких как рептилии, амфибии, куры и индейки. Композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения любого подходящего млекопитающего, включая приматов, таких как обезьяны и люди, лошадей, коров, кошек, собак, кроликов и грызунов, таких как крысы и мыши. В одном варианте осуществления подлежащее лечению млекопитающее представляет собой человека. Человек может быть любым человеком любого возраста. В одном варианте осуществления человек представляет собой взрослого человека. В другом варианте осуществления человек представляет собой ребенка. Человек может быть мужского пола, женского пола, беременной женщиной, человеком среднего возраста, подростком или пожилым человеком.

[0104] Фармацевтические композиции, подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают в себя композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное

количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, ослабления или облегчения симптомов заболевания или продления жизни субъекта, получающего лечение. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области.

[0105] Используемый в настоящем документе термин «модулирование» означает «стимулирование» или «ингибирование» активности молекулярной мишени или пути. Например, композиция модулирует активность молекулярной мишени или пути, если она стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени или пути на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере около 20%, на по меньшей мере около 25%, на по меньшей мере около 30%, на по меньшей мере около 40%, на по меньшей мере около 50%, на по меньшей мере около 60%, на по меньшей мере около 70%, на по меньшей мере около 75%, на по меньшей мере около 80%, на по меньшей мере около 90%, на по меньшей мере около 95%, на по меньшей мере около 98% или на около 99% или более по сравнению с активностью молекулярной мишени или пути в тех же условиях, но только в отсутствие композиции. В другом примере композиция модулирует активность молекулярной мишени или пути, если она стимулирует или ингибирует активность молекулярной мишени или пути по в меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 50 раз, в по меньшей мере 100 раз относительно активности молекулярной мишени или пути в тех же условиях, но только в отсутствие композиции. Активность молекулярной мишени или пути можно измерять любыми воспроизводимыми способами. Активность молекулярной мишени или пути можно измерять *in vitro* или *in vivo*. Например, активность молекулярной мишени или пути можно измерять *in vitro* или *in vivo* посредством соответствующего анализа, известного в данной области измерения активности.

Контрольные образцы (необработанные композицией) можно принять за величину относительной активности 100%.

[0106] В одном варианте осуществления способ включает стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к 5T4, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0107] Специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления модуляция иммунного ответа включает уменьшение воспаления или устранение воспаления в ситуации, при которой ожидаемым исходом без применения антитела к 5T4, описанного в настоящем документе, будет воспаление. Специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления лечение опухоли или рака включает уменьшение размера, роста и или распространения опухоли или рака по сравнению с исходом без применения антитела к 5T4, описанного в настоящем документе.

[0108] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к 5T4, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к 5T4, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0109] В одном варианте осуществления в настоящем описании также предложены варианты применения композиции, содержащей антитела к 5T4, для лечения заболевания у субъекта. В одном варианте осуществления композиция

содержит антитела к 5Т4, имеющие последовательности CDR тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция содержит антитела к 5Т4, имеющие последовательности VH и VL, описанные в настоящем документе.

[0110] В одном варианте осуществления точное количество настоящих полипептидов или их композиций, необходимое для вызова желаемых эффектов, будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от биологического вида, возраста, пола, веса и общего состояния субъекта, конкретных полипептидов, способа введения и того, включены ли другие лекарственные средства в схему лечения. Поэтому нет возможности указать точное количество для каждой композиции. Однако конкретное количество может быть определено одним из специалистов в данной области, исходя из обычных экспериментов. Дозировки могут варьироваться, и полипептиды можно вводить в виде одной или более (например, двух или более, трех или более, четырех или более, или пяти или более) доз ежедневно в течение одного или более дней. Указания по подбору соответствующих доз антител можно легко найти в литературе.

[0111] В другом варианте осуществления заболевание представляет собой рак, который может представлять собой, без ограничений, карциному, саркому, лимфому, лейкоз, герминогенную опухоль, бластому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, остеосаркому, рабдомиосаркому, рак сердца, рак головного мозга, астроцитому, глиому, медуллобластому, нейробластому, рак молочной железы, медуллярную карциному, аденокортикальную карциному, рак щитовидной железы, карциному из клеток Меркеля, рак глаза, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гепатоцеллюлярный рак, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, почечно-клеточный рак, рак предстательной железы,

рак яичек, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак головы, рак шеи, карциному носоглотки, рак кровеносной системы, неходжкинскую лимфому, рак кожи, базальноклеточную карциному, меланому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого или любую их комбинацию.

[0112] В другом варианте осуществления заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, которое может представлять собой, без ограничений, ахалазию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, анти-гбм/анти-тбм нефрит, антифосфолипидный синдром, артрит, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную крапивницу, болезнь Бехчета, целиакию, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Когана, врожденную блокаду сердца, болезнь Крона, дерматит, дерматомиозит, дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гранулематоз с полиангиитом, болезнь Грейвса, синдром Гийена — Барре, герпес беременных, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет 1 типа), ювенильный миозит, болезнь Кавасаки, синдром Ламберта — Итона, красный плоский лишай, волчанку, болезнь Лайма, рассеянный склероз, миастению гравис, миозит, неонатальную волчанку, нейтропению, палиндромный ревматизм, периферическую невропатию, узелковый полиартериит, ревматическую полимиалгию, полимиозит, синдром после инфаркта миокарда, синдром после перикардотомии, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориатический артрит, реактивный артрит, забрюшинный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию,

синдром Шегрена, тромбоцитопеническую пурпуру, сахарный диабет 1 типа, язвенный колит, увеит, васкулит и витилиго.

[0113] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой заболевания, связанные с трансплантацией, такие как реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD). Согласно одному варианту осуществления, GVHD представляет собой острую GVHD. Согласно другому варианту осуществления, GVHD представляет собой хроническую GVHD.

[0114] В другом варианте осуществления в настоящем описании предложен способ применения полинуклеотида для лечения заболевания или состояния, описанного выше, причем полинуклеотид кодирует антитело к 5T4, описанное в настоящем документе.

[0115] Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержат», «содержащий», «включает», «включающий», «имеющий» и их подобия означают «включая, без ограничений».

[0116] При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин «антитело» или «по меньшей мере одно антитело» может включать множество антител.

[0117] В настоящей заявке различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено исключительно для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение, накладываемое на сущность антител к 5T4 и варианты их применения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона включает все возможные конкретные поддиапазоны, а также отдельные численные значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, например, от 1 до 6, следует рассматривать как описание конкретных поддиапазонов, например, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от

2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельных чисел в этом диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это не зависит от широты диапазона.

[0118] При любом указании численного диапазона в настоящем документе подразумевается, что он включает любое упомянутое число (дробное или целое) в пределах указанного диапазона. Фразы «варьирует между» первым указанным числом и вторым указанным числом и «находится в диапазоне от» первого указанного числа «до» второго указанного числа используются в настоящем документе взаимозаменяемо и предназначены для включения первого и второго указанных чисел, а также всех дробных и целых чисел между ними.

[0119] Когда значения указаны как приблизительные с использованием предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение формирует другой вариант осуществления. Все диапазоны являются включающими и комбинируемыми. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению в пределах 0,1–5% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин «около» относится к отклонению в пределах 1–10% от указанного числа или диапазона чисел. В другом варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до 20% от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до $\pm 10\%$ от указанного числа или диапазона чисел. В одном варианте осуществления термин «около» относится к отклонению до $\pm 5\%$ от указанного числа или диапазона чисел.

[0120] Все технические и/или научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области, к которой относятся антитела к 5T4 и варианты их применения. В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для проверки или анализа вариантов осуществления антител к 5T4 и вариантов их применения можно использовать способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны ниже. В случае конфликта

преимущественную силу имеет описание патента, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения. Каждый литературный источник или другая цитата в настоящем документе включается в данный документ путем ссылки в полном объеме.

[0121] В описании, представленном в настоящем документе, описана каждая из стадий получения и использования антител к 5T4 и их вариаций. Это описание не подразумевает ограничений, и возможны изменения компонентов, последовательности стадий и другие вариации, которые следует понимать как входящие в объем настоящих антител к 5T4 и вариантов их применения.

[0122] Следует понимать, что определенные признаки антител к 5T4 и вариантов их применения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предложены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки антител к 5T4 и вариантов их применения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предложены отдельно, или в любой подходящей подкомбинации, или в любом другом подходящем описанном варианте осуществления антител к 5T4 и вариантов их применения. Определенные особенности, описанные в контексте различных вариантов реализации, не следует рассматривать как важные особенности этих вариантов реализации, если только вариант реализации не действует без этих элементов.

[0123] Различные варианты осуществления и аспекты настоящих антител к 5T4 и вариантов их применения, изложенные выше в настоящем документе и заявленные в разделе формулы изобретения ниже, получают экспериментальную поддержку в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Получение моноклонального антитела к 5T4 в мышинной гибридоме

[0124] *Цель:* получение моноклональных антител к 5T4 с использованием технологии мышинной гибридомы.

[0125] *Методы:* получение антител к 5T4 в мышинной гибридоме. Антитела к 5T4 были созданы путем в/б / п/к иммунизации мышей SJL белком 5T4-ECD-hFc. У животных брали кровь и проверяли на титр антител с помощью твердофазного ИФА (тестовый забор крови 1 и тестовый забор крови 2). Клетки селезенки от иммунизированных мышей с высоким титром выделяли и сливали с использованием стандартных процедур слияния для создания гибридомы, продуцирующей специфические антитела. Супернатанты, содержащие антитела, продуцируемые пулами этих клеток, подвергали первичному скринингу с помощью твердофазного ИФА на реактивность к белку 5T4-ECD, слитому с Fc человека (5T4-ECD-hFc), и вторичному скринингу с помощью FACS на реактивность к клеткам, сверхэкспрессирующим белок 5T4. Для скрининга протестировали с помощью FACS большое количество супернатантов гибридом на целевую активность антител.

[0126] Сверхэкспрессирующие клетки-мишени помещали в 96-луночные круглодонные полистирольные планшеты и инкубировали с чистыми супернатантами культур гибридом. Затем клетки промывали, инкубировали с флуоресцентно-меченым вторичным антителом. В качестве отрицательного контроля для проверки супернатантов, чтобы подтвердить, что реактивное антитело специфически распознает белок-мишень, использовали трансфицированные нецелевым белком исходные клетки (и оказалось, что реакция отсутствует). Положительные пулы идентифицировали и клонировали путем предельного разведения. После 1–2 слияний, положительные клоны,

продуцирующие специфические антитела, были идентифицированы и селектированы с помощью твердофазного ИФА и FACS.

[0127] *Результаты:* после иммунизации животных сыворотку тестировали на связывание с рекомбинантным человеческим белком ECD 5T4, слитым с Fc человека, с помощью твердофазного ИФА и FACS. Как показано на **Фиг. 1A–1B**, тестовый забор крови 2 у животных, иммунизированных п/к (**Фиг. 1A**) или в/б (**Фиг. 1B**) в различных разведениях, продемонстрировал положительный титр против 5T4 человека по данным твердофазного ИФА по сравнению с образцами предварительно взятой крови. На **Фиг. 1C–1D** показан положительный титр последовательного разведения тестового забора крови 2 против 5T4 человека, сверхэкспрессируемого в клетках СНО (**Фиг. 1C**), при отсутствии связывания с родительскими клетками СНО (**Фиг. 1D**), что указывает на специфичность к 5T4. После анализа взятых образцов крови были отобраны животные SJL № 7211 и № 7215 для проведения слияния. После электрослияния получили 96-луночные планшеты для первичного скрининга и 24-луночные планшеты для вторичного скрининга для идентификации положительных клонов с помощью твердофазного ИФА в отношении рекомбинантного человеческого 5T4-ECD-Fc, причем Fc человека служил в качестве отрицательного контроля, а также в отношении клеток СНО, сверхэкспрессирующих 5T4 человека или 5T4 яванского макака, для идентификации перекрестно-реактивных клонов, при этом родительские клетки СНО служили отрицательным контролем. В первичном скрининге отобрали 200 клонов для вторичного скрининга. Вторичный скрининг выявил 30 клонов, которые дополнительно подвергали субклонированию, и 19 клонов переводили в стадию экспрессии в объеме 200 мл и очистки белком А. На **Фиг. 2** показаны идентификаторы выбранных клонов. Полный перечень антител 5T4 и идентификаторы выбранных клонов показаны на **Фиг. 2**. Перечень антител 5T4 и их компонентов, описанных в настоящем документе, представлен ниже в таблице 1, вместе с соответствующими SEQ ID NO.

[0128] *Обзор:* создание моноклональных гибридом мыши против белка 5T4 человека привело к получению 19 клонов, которые были идентифицированы после первичного и вторичного скрининга с помощью твердофазного ИФА и FACS как обеспечивающие специфическую связь с 5T4 человека и яванского макака. Эти клоны дополнительно экспрессировали, очищали и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и с помощью ЭХР-ВЭЖХ и давали характеристику эффективности связывания.

ПРИМЕР 2

Характеризация связывания моноклональных антител из мышинной гибридомы к 5T4 человека

[0129] *Цель:* экспрессировать, очистить и охарактеризовать моноклональные антитела мыши к 5T4 по связыванию.

[0130] *Методы:* экспрессия и очистка клонов гибридомы. Вкратце около $0,25-0,5 \times 10^7$ клеток сеяли в роллер-флакон, предварительно заполненный 100 мл среды для продукции антител (Hybridoma-SFM + 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (с низким содержанием IgG), и инкубировали в роллерном устройстве для культивирования при скорости 300 об/ч в течение 14–16 дней при 37 °C, без CO₂. После этого клеточную суспензию переносили в центрифужную бутылку объемом 350 мл и центрифугировали при 3220 g, 4 °C в течение 15 мин, а затем фильтровали с помощью фильтровальной капсулы 0,45 мкм для удаления клеток и клеточного дебриса. Затем супернатант культуры загружали в предварительно уравновешенную аффинную колонку с белком А для аффинной очистки. Антитело элюировали из колонки 5 CV (объемов колонки) элюирующего буфера (буфер 0,1 М цитрат натрия, pH 3,0) и нейтрализовали до конечного pH 7,0 основанием Trizma, а затем диализировали в 100-кратном объеме элюирования фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), pH 7,4, при 2–8 °C в течение ночи и стерилизовали фильтрованием через шприцевой фильтр

0,22 мкм в боксе биологической безопасности. Затем очищенное антитело аликвотировали и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования.

[0131] *Связывание с целевым белком по данным твердофазного ИФА.* Вкратце целевой белок h5T4-His (кат. № 19845-H08H, поставщик Sino Biological) разводили в PBS до конечной концентрации 0,3 мкг/мл h5T4-His и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning) соответственно. Инкубировали в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Планшеты блокировали 250 мкл 1%-го бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буферном растворе с твином (PBST) в течение 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Четыре раза промывали PBST. Все промывки выполняли с использованием Biotek (Elx 405). Для всех антител делали последовательные разведения и наносили разведенное антитело на планшет 100 мкл/лунка, инкубировали в течение 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Промывали PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка антител к IgG мыши (Fab-специфических) с пероксидазой хрена (HRP) (SIGMA A3682) 1 : 10 000, инкубировали в течение 0,5 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Промывали PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCl для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм (прибор SpectraMax M5e). Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 5, используя нелинейную регрессию (аппроксимацию кривой) для зависимости \log (агонист) против ответа, где агонист представляет собой концентрацию антитела (нМ), а ответ представляет собой значение оптической плотности (OD).

[0132] *Связывание с клетками по данным FACS.* Вкратце клетки суспензионной культуры собирали напрямую или прикрепленные клетки отщепляли ферментом TrypLE Express (кат. № 12604-013, поставщик Life technologies) перед сбором. Центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и отбрасывали супернатант.

Клетки суспендировали в концентрации 2×10^6 /мл в буфере для FACS (2% FBS в PBS) и наносили по 100 мкл/лунка клеточной суспензии на планшет (кат. № 3799, поставщик Corning). Центрифугировали планшеты при 2000 об/мин в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунка антител набора Tribody (400 нМ исходная, 4-кратное разведение, 8 точек, включая точку 0) и планшет инкубировали в течение 60 мин при 4 °С. Центрифугировали планшет при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Затем промывали клетки 3 раза 170 мкл буфера для FACS. Ресуспендировали клетки в концентрации 100 мкл/лунка со вторичным антителом и инкубировали планшет в течение 30 мин при 4 °С в темноте. Центрифугировали планшет при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Затем клетки промывали 3 раза буфером для FACS и анализировали образец с помощью FACS verse.

[0133] *Аффинности связывания по данным анализа Octet.* Вкратце мАт анализировали с помощью прибора Octet RED 384, где человеческий антиген 5Т4-ECD Fc в концентрации 200 нМ и 100 нМ выступал в качестве аналита, а очищенные мАт в концентрации 5 мкг/мл выступали в качестве лиганда, связанного с сенсором АМС (антитело к Fc мыши), фаза иммобилизации: 180 с, фаза ассоциации: 300 с, фаза диссоциации: 180 с.

[0134] *Группировка по эпитопам с помощью твердофазного ИФА.* Вкратце целевые антитела к 5Т4 человека разводили в PBS до конечной концентрации 1 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °С. После блокирования с помощью 250 мкл 1% BSA в PBST в течение 1 ч при 37 °С добавляли последовательные концентрации биотинилированного антигена h5Т4-His (партия: 1906191701, CP). Промывали планшет PBST 3 раза после инкубации в течение 1,5 ч при 37 °С, затем добавляли по 100 мкл стрептавидин-HRP (кат. S5512, поставщик Sigma, 1 : 10 000) на каждую лунку. После инкубации в течение

1 ч при 37 °С промывали планшет PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCL для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм. Определяли значение EC80 антигена с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 5.

[0135] **Результаты:** на **Фиг. 3А–3В** показан анализ методом ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях 19 выбранных очищенных антител, демонстрирующий 16 хорошо продуцируемых клонов, с двумя полосами на уровне ожидаемых размеров полос HC и LC (50 кДа и 25 кДа соответственно) для каждого. На **Фиг. 4А–4Р** показан анализ методом ЭХР-ВЭЖХ выбранных очищенных клонов, показывающий один острый и равномерный пик при времени удержания в диапазоне от ~8 до ~13 мин на ЭХР-ВЭЖХ. Эти результаты согласуются с ожидаемым временем удержания для ожидаемой Mw на основе кривой калибровки массы.

[0136] На **Фиг. 5А–D** показано связывание очищенных мАт с антигеном 5Т4-ЕСD-Fc по данным твердофазного ИФА. Исключая мАт 2, 4, 6, 7, 11 и 12, значения EC50 среди этих антител варьировались от 0,13 нМ до 0,42 нМ.

[0137] На **Фиг. 6А–6Н** показано связывание по данным FACS выбранных очищенных мАт с клетками СНО, сверхэкспрессирующими 5Т4 человека (**Фиг. 6А–6С**) и 5Т4 яванского макака (**Фиг. 6D–F**), а также с MCF-7—клеточной линией рака молочной железы, которая эндогенно экспрессирует антиген 5Т4 человека (**Фиг. 6G–6H**). Как показано на **Фиг. 6А–6H**, за исключением мАт001 и 017 все протестированные мАт имели диапазон значений EC50 ~1–4,9 нМ с клетками СНО, сверхэкспрессирующими 5Т4 человека или яванского макака, в то время как при использовании клеток MCF-7, которые эндогенно экспрессируют белок 5Т4 человека, наблюдали более

широкий диапазон значений EC50. Связывания не наблюдали на исходных клетках СНО (данные не показаны).

[0138] На Фиг. 7A–7G показаны данные Octet для определения KD для аффинностей выбранных мАт. На Фиг. 7A–7F показан Octet-анализ, и на Фиг. 7G показаны ранжированные значения KD 2,088E-10M, 2,321E-10M, 2,688E-10M, 4,634E-10M, 2,691E-09M и 5,674E-09M для следующих мАт: мАт008 > мАт016/мАт018 > мАт010 > мАт005/ мАт006 соответственно.

[0139] На Фиг. 8 показана сводка по анализу группировки по эпитомам, выполненному с помощью твердофазного ИФА. Анализ твердофазным ИФА указывает, что 3 основные группы, различавшиеся по группировкам эпитопов, таковы: группа 1 (круг, сплошная линия) объединяет мАт001, мАт003, мАт008, мАт009, мАт010, мАт014, мАт015 и мАт017. Группа 2 (квадрат, пунктирная линия) объединяет мАт004, мАт005 и мАт006, и группа 3 (круг, пунктирная линия) объединяет мАт013, мАт016, мАт018 и мАт019.

[0140] *Обзор:* моноклональные антитела (мАт) к 5T4 человека были успешно сгенерированы с использованием технологии гибридомы. Были идентифицированы и охарактеризованы 19 клонов. мАт были дополнительно экспрессированы и продуцированы клонами гибридом, их дополнительно очищали и давали характеристику с помощью твердофазного ИФА на связывание с антигеном 5T4, а также с помощью FACS на связывание с клетками, экспрессирующими 5T4 человека и яванского макака, на аффинность по данным анализа Octet и, наконец, на группировку по эпитомам с помощью твердофазного ИФА. Далее отбирали два мАт для дальнейшей работы.

ПРИМЕР 3

Рекомбинантная продукция химерных мАт из антител к 5T4 человека, полученных из клонов гибридомы мыши против 5T4 человека

[0141] *Цель:* внедрить последовательности CDR мыши из мАт к 5Т4 человека в формат конструктора IgG1 человека или в формат конструктора Tribody для получения химерного антитела.

[0142] *Методы:* вкратце выбранные положительные моноклональные гибридомные клетки ($\sim 1 \times 10^7$) собирали для выделения общей РНК в соответствии с протоколом для реагента NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, 740404.200). Общую РНК использовали для синтеза кДНК в соответствии с руководством к набору SMARTer® RACE 5'/3' и использовали случайный праймер для синтеза кДНК первой цепи. Для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепей методом ПЦР использовали синтетическую кДНК в качестве матрицы и праймеры из набора Ig-Primer Set (Novagen, 69831-3) в качестве ген-специфического праймера (GSP). Собирали продукты ПЦР нужного размера, очищали с помощью реактивов NucleoSpin® Gel и PCR Cleanup (Macherey-Nagel, 740609.250) в соответствии с руководством набора и подвергали ТА-клонированию и секвенированию.

[0143] Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL) мАт к 5Т4 клонировали в человеческий IgG1 для получения химерного IgG1, который подвергали повторному скринингу на связывание с помощью твердофазного ИФА и FACS. Аналогично VH и VL из мАт к 5Т4 клонировали в Tribody и характеризовали на связывание с белком 5Т4 с помощью твердофазного ИФА и FACS.

[0144] *Результаты:* выбранные клоны гибридомы (мАт003, мАт006, мАт008, мАт10, мАт014, мАт016 и мАт018) секвенировали, как описано в способах выше, и получали последовательности переменной области тяжелой цепи (HC) и переменной области легкой цепи (LC) для каждого из клонов. Последовательности переменной области тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) мАт008 и мАт0016 вводили либо в экспрессионные векторы hIgG1, либо в экспрессионные векторы Tribody, совместно трансфицировали и очищали либо с

помощью колонки с белком А для формата hIgG1, либо с помощью аффинной хроматографии для формата Tribody. Анализ Octet подтвердил значения аффинности $1,47E-08M$ для mAt0016-IgG1 и $4,52E-10M$ (данные не показаны).

[0145] В таблице 1 представлена ссылка на данные, представленные в примерах различных проанализированных вариантов осуществления антител к 5T4.

Таблица 1. SEQ ID NO, названия клонов и компоненты антител

SEQ ID NO:	Название	Компонент Ат
1	IM, мышьяная гибридома к 5T4, cl-16	VH
2		CDR1
3		CDR2
4		CDR3
5		VL
6		CDR1
7		CDR2
8		CDR3
9	IM, мышьяная гибридома к 5T4, cl-8	VH
10		CDR1
11		CDR2
12		CDR3
13		VL
14		CDR1
15		CDR2
16		CDR3
17	IM, мышьяная гибридома к 5T4, cl-3	VH
18		CDR1
19		CDR2
20		CDR3
21		VL
22		CDR1
23		CDR2
24		CDR3
25	IM, мышьяная гибридома к 5T4, cl-5	VH
26		CDR1
27		CDR2
28		CDR3
29		VL
30		CDR1

31		CDR2
32		CDR3
33	IM, мышиная гибридома к 5T4, cl-6	VH
34		CDR1
35		CDR2
36		CDR3
37		VL
38		CDR1
39		CDR2
40		CDR3
41	IM, мышиная гибридома к 5T4, cl-10	VH
42		CDR1
43		CDR2
44		CDR3
45		VL
46		CDR1
47		CDR2
48		CDR3
49	IM, мышиная гибридома к 5T4, cl-14	VH
50		CDR1
51		CDR2
52		CDR3
53		VL
54		CDR1
55		CDR2
56		CDR3
57	IM, мышиная гибридома к 5T4, cl-18	VH
58		CDR1
59		CDR2
60		CDR3
61		VL
62		CDR1
63		CDR2
64		CDR3
IM к 5T4, гуманизированные последовательности (на основе CDR-областей cl-8 и cl-16)		
65	5T4_IM_11	VH
66		VL
67	5T4_IM_12	VH
68		VL
69	5T4_IM_13	VH

70		VL
71	5T4 IM 14	VH
72		VL
73	5T4 IM 15	VH
74		VL
75	5T4 IM 16	VH
76		VL
77	5T4 IM 17	VH
78		VL
79	5T4 IM 18	VH
80		VL
81	5T4 IM 19	VH
82		VL
83	5T4 IM 20	VH
84		VL
85	5T4 IM 21; 5T4 IM 22	VH
86		VL
87	5T4 IM 23; 5T4 IM 24	VH
88		VL
89	5T4 IM 25; 5T4 IM 26	VH
90		VL
91	5T4 IM 27; 5T4 IM 28	VH
92		VL
93	5T4 IM 29	VH
94		VL
95	5T4 IM 30	VH
96		VL
97	5T4 IM 31	VH
98		VL
99	5T4 IM 32	VH
100		VL
101	5T4 IM 33	VH
102		VL
103	5T4 IM 34	VH
104		VL
105	5T4 IM 35	VH
106		VL
107	5T4 IM 36	VH
108		VL
109	5T4 IM 37	VH
110		VL

111	5T4 IM 38	VH
112		VL
113	5T4 IM 39	VH
114		VL
115	5T4 IM 40	VH
116		VL
117	5T4 IM 41	VH
118		VL
119	5T4 IM 42	VH
120		VL
121	5T4 IM 43	VH
122		VL
123	5T4 IM 44	VH
124		VL
125	5T4 IM 45	VH
126		VL
127	5T4 IM 46	VH
128		VL
129	5T4 IM 47	VH
130		VL
131	5T4 IM 48	VH
132		VL
133	5T4 IM 49	VH
134		VL
135	5T4 IM 50	VH
136		VL
137	5T4 IM 51	VH
138		VL
139	5T4 IM 52	VH
140		VL
141	5T4 IM 53	VH
142		VL
143	5T4 IM 54	VH
144		VL
145	5T4 IM 55	VH
146		VL
147	5T4 IM 56	VH
148		VL
149	5T4 IM 57	VH
150		VL
151	5T4 IM 58	VH

152		VL
153	ScFv к 5Т4	VH
154		CDR1
155		CDR2
156		CDR3
157		VL
158		CDR1
159		CDR2
160		CDR3

[0146] Химерные антитела hIgG1 тестировали на связывание с помощью твердофазного ИФА и FACS. Наблюдали значения EC50 0,4 нМ и 0,3 нМ для химерных антител mAт008-hIgG1 и mAт016-hIgG1 соответственно в анализе связывания с рекомбинантным белком 5Т4 с помощью твердофазного ИФА (Фиг. 9А). Наблюдали значения EC50 5 нМ и 1,1 нМ для химерных антител mAт008-hIgG1 и mAт016-hIgG1 соответственно в анализе связывания с клетками СНО, сверхэкспрессирующими белок 5Т4 с помощью FACS (Фиг. 9В). Аналогичные результаты связывания наблюдались при FACS-анализе связывания с клеточной линией MCF-7, эндогенно экспрессирующей белок 5Т4, с EC50 4,4 нМ и 0,9 нМ для химерных антител mAт008-hIgG1 и mAт016-hIgG1 соответственно (Фиг. 9С). Аналогичные результаты связывания наблюдались при FACS-анализе связывания с клеточной линией СНО, сверхэкспрессирующей белок 5Т4, с EC50 5,7 нМ и 2,2 нМ для химерных антител mAт008-hIgG1 и mAт016-hIgG1 соответственно (данные не показаны).

[0147] Аналогичным образом проверяли данные твердофазного ИФА и FACS по связыванию для химерных форматов Tribody (данные не показаны).

[0148] *Обзор:* переменные домены легкой цепи (VL) и переменные домены тяжелой цепи (VH) мыши секвенировали из выбранных клонов гибридомы, превращали в scFv и синтезировали в качестве компонентов либо hIgG, либо конструкторов Tribody с образованием химерных молекул. Эти молекулы экспрессировали, очищали и дополнительно характеризовали с помощью

анализов связывания и продемонстрировали, что характеристики связывания с 5Т4 человека сохраняются.

ПРИМЕР 4

Гуманизация, экспрессия, очистка и характеристика полностью гуманизованных антительных конструкторов Tribody

[0149] *Цель:* экспрессия, очистка и отбор полностью гуманизованного триспецифического антительного конструктора Tribody после гуманизации последовательностей мышинных антител к 5Т4 человека.

[0150] *Методы:* *гуманизация:* вкратце остатки CDR в переменных областях тяжелой цепи и легкой цепи (CDR в VH/VL) мАт016 определяли и аннотировали по системе нумерации по Кабату. После анализа в области CDR H2 идентифицировали опасную горячую точку мотива дезамидирования (NG), для которого были сконструированы мутации в QG, SG, NA.

[0151] Для VH и VL мАт016 выполняли два отдельных поиска Ig в BLAST. Зародышевые линии IGHV-2*02 и IGKV3-11*01 человека с высокой идентичностью каркасной последовательности с мАт016 были выбраны в качестве акцепторного каркаса зародышевой линии человека для прививки CDR VH и VL соответственно. При этом JH6 и JK4 были выбраны в качестве J-области VH и VL на основе наилучшей гомологии последовательности.

[0152] Для построения модели гомологии использовали пакет для моделирования BioLuminate из пакета программного обеспечения Schrodinger. Структура антитела 2W9D (код PDB) была выбрана в качестве матрицы для моделирования тяжелой и легкой цепей. Модель, сгенерированную в BioLuminate, дополнительно анализировали для идентификации остатков в каркасных областях, которые потенциально поддерживают петлевые структуры CDR и интерфейс VH/VL. Эти остатки, которые могут оказывать влияние на конформацию петли CDR и

интерфейс VH/VL, подвергали обратной мутации. Наконец, была разработана панель гуманизованных вариантов mAt016 и сконструирована в формате Tribody.

[0153] Реализовали дополнительную стратегию гуманизации. Вкратце применяли технологию *tabHuman* для прививки CDR mAt008 и mAt016 новым каркасам антител. На основе экспериментов с NGS-секвенированием после выравнивания последовательностей были выявлены различные последовательности VH и VL в базе последовательностей каркасных областей человеческих антител.

[0154] *Синтез генов и конструирование плазмиды.* Кодированные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) триспецифического антитела получали путем синтеза ДНК и методом ПЦР, затем субклонировали в плазмиду на основе pCDNA3.4 (Invitrogen) для экспрессии белка в системе клеток млекопитающего. Наконец генные последовательности в экспрессионных векторах подтверждали секвенированием ДНК.

[0155] *Экспрессия триспецифического антительного конструкта.* Временную экспрессию антител Tribody/Pro-Tribody проводили путем котрансфекции парных конструкций HC и LC (соотношение HC/LC 1 : 1 для формата Tribody или отношение HC/LC 2,5 : 1 для формата ProTribody) в клетки CHO с использованием полиэтиленимидного метода (PEI). Вкратце 1 л клеток CHO в концентрации приблизительно $5,5 \times 10^6$ /мл в 3-литровой колбе для встряхивания использовали в качестве клеток-хозяев. Трансфекцию инициировали добавлением смеси 1 мг общей ДНК и 4 мг PEI в 100 мл среды OptiMEM (Invitrogen) к клеткам и осторожным перемешиванием. Затем клетки культивировали в инкубаторе-шейкере при 120 об/мин, 37 °C и 8% CO₂ в течение 8–10 дней. Подкармливание пептоном и глюкозой проводили через 24 ч и каждые 2–3 дня в зависимости от плотности и жизнеспособности клеток. Культивирование клеток прекращали на 8–10-й день, когда жизнеспособность

клеток снижалась до < 80%. Кондиционированную среду собирали для очистки белка.

[0156] *Очистка триспецифического антительного конструктора.* Очистку белка путем аффинной хроматографии и ЭХР проводили с использованием прибора АКТА pure (GE Lifesciences). Аффинный захват антитела Tribody был достигнут путем пропускания собранных супернатантов через колонку CaptureSelect™ CN1-XL Affinity Matrix (Thermo Scientific). После промывки колонки буфером А (25 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, pH 7,5) белок элюировали буфером В (50 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, pH 3,0) и немедленно нейтрализовали 1/6 объема колонки буфера D (1 М аргинина, 400 мМ янтарной кислоты, pH 9,0). Аффинно очищенный белок затем концентрировали до 5–10 мг/мл с использованием концентратора Amicon 30kD (Merck Millipore) и подвергали очистке ЭХР на колонке Superdex200 (GE Lifesciences), уравновешенной буфером для ЭХР: 200 мМ аргинина, 137 мМ янтарной кислоты, 0,05% Tween-80, 150 мМ NaCl, pH 5,0. Собирали целевые фракции Tribody, затем добавляли 5% трегалозы (146 мМ). Готовые продукты Tribody анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и ВЭЖХ-ЭХР.

[0157] *Анализ триспецифического антительного конструктора с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.* Анализ антитела Tribody методом ДСН-ПААГ-электрофореза проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в предварительно отлитых полиакриламидных гелях. Вкратце 2 мкг образцов Tribody смешивали с буфером для образцов NuPAGE™ LDS (Thermofisher NP0008) с добавлением 70 мМ ДТТ или без него. После инкубации при 25 °С или 90 °С в течение 10 мин образцы и неокрашенные стандарты белка (BIO RAD-161–0363) загружали на гели. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 120 В с подвижным буфером 1 × Tris-глицин-ДСН. После электрофореза гели окрашивали в течение ночи с использованием Кумасси синего и убирали краситель раствором для обесцвечивания (10% уксусной кислоты, 40%

метанола и 50% воды). Обесцвеченные гели сканировали с помощью системы визуализации гелей (Tanon-2500R).

[0158] Анализ предшественника триспецифического антительного конструкта методом ЭХР-ВЭЖХ. Аналитические ЭХР-ВЭЖХ проводили с использованием прибора Shimadzu LC-10 HPLC (Shimadzu Corp.). 20 мкл образца при 1 мг/мл загружают на колонку Superdex 200 Increase 5/150GL (GE Lifesciences). Подвижная фаза представляла собой 2 * PBS со скоростью потока 0,3 мл/мин, 15 мин.

[0159] ЖХ-МС анализ конструкта Tribody. Tribody отделяли на ЭХР-колонке ACQUITY UPLC BEH200 Å, SEC (Waters 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм) при комнатной температуре и детектировали с помощью ИЭР-МС (Thermo, MS-B20-03). Подвижная фаза представляла собой раствор 0,1% муравьиная кислота : ацетонитрил (75 : 25, об./об.) со скоростью потока 0,2 мл/мин. Масс-спектрометрию проводили по положительному иону. Другие параметры масс-спектрометрии были такими: разрешение 17500, диапазон сканирования 1000–5000 m/z, CID в источнике 60 эВ, скорость потока защитного газа 30 л/мин, температура капилляра 350 °С, напряжение распыления 2,5 кВ.

[0160] *Результаты:* процесс гуманизации мАт к 5Т4 из обеих стратегий давал новые последовательности Tribody: молекулы IM-1100-1109, соответствующие последовательностям 5Т4_IM11-20, молекулы IM-1198-1227, соответствующие последовательностям 5Т4_IM29-58, и молекулы IM-1175-1182, соответствующие последовательностям 5Т4_IM21-28, причем HC молекулы Tribody состоит из тяжелой цепи антитела к CD3 (VH-CH), слитой с рекрутирующим НК-клетки антителом (scFv), и LC молекулы Tribody состоит из легкой цепи антитела к CD3 (VL-CL), слитой с антителом к 5Т4 (VH-VL/VL-VH), как схематически показано на **Фиг. 10А**. (Названия 5Т4 клонов и соответствующие SEQ ID NO см. в таблице 1 выше). На **Фиг. 10В** показана структура ProTribody с дополнительными регуляторными доменами, такими как маскирующий домен CAP, фрагмент HSA и линкер для расщепления протеазой, с получением активируемой при заданных

условиях молекулы, ранее описанной, например, в публикации WO 2020/225805, полностью включенной в настоящий документ.

[0161] На **Фиг. 11** показано разнообразие результатов ДСН-ПААГ-электрофореза различных конструкторов для демонстрации широкого спектра характеристик экспрессируемых белков.

[0162] Экспрессированные НС и LC конструкторов Tribody IM-1222 ассоциировались с образованием единой молекулы, на что указывает одна полоса ~100 кДа, наблюдаемая на ДСН-ПААГ-электрофорезе (в невосстанавливающих условиях), и один крупный пик с временем удержания ~5,8 мин на ЭХР-ВЭЖХ (**Фиг. 12А** и **12В** соответственно). Эти результаты согласуются с ожидаемым временем удержания для ожидаемой Mw на основе кривой калибровки массы.

[0163] МС-анализ конструкторов Tribody IM-1222 подтвердил пик 50 кДа для LC, пик 52 кДа для НС в восстанавливающих условиях (**Фиг. 13А**) и пик 102 кДа для интактного белка (**Фиг. 13В**).

[0164] Экспрессированные НС и LC конструкторов Tribody IM-1178 ассоциировались с образованием единой молекулы, на что указывает одна полоса ~100 кДа, наблюдаемая на ДСН-ПААГ-электрофорезе (в невосстанавливающих условиях), и крупный пик с временем удержания ~5,8 мин на ЭХР-ВЭЖХ (**Фиг. 14А** и **14В** соответственно). Эти результаты согласуются с ожидаемым временем удержания для ожидаемой Mw на основе кривой калибровки массы.

[0165] МС-анализ конструкторов Tribody IM-1178 подтвердил пик 49 кДа для LC, пик 51 кДа для НС в восстанавливающих условиях (**Фиг. 15А**) и пик 100 кДа для интактного белка (**Фиг. 15В**).

[0166] *Обзор:* множество молекул 5Т4 с гуманизированными последовательностями в структуре Tribody экспрессировали и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, ЭХР-ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Различные продукты обладали различными качествами с точки зрения чистоты и

выхода. На **Фиг. 13А–13В** показан пример выбранного конструкта, Tribody IM-1222, который соответствует последовательности 5Т4_ИМ53, полученной из МАт016. На **Фиг. 14А–14В** показан пример выбранного конструкта, Tribody IM-1178, который соответствует последовательности 5Т4_ИМ24, полученной из МАт008, включающей в себя CD3х5Т4_ИМ24хNKG2D.

ПРИМЕР 5

Связывание полностью гуманизованных антительных конструктов Tribody с рекомбинантными белками по данным твердофазного ИФА

[0167] Цель: исследовать эффективность связывания гуманизованных антительных конструктов Tribody против 5Т4 с помощью твердофазного ИФА. Эти конструкты состояли из домена ScFv к ТАА (гуманизованное антитело к 5Т4), рекрутирующего Т-клетки домена (Fab к CD3ε) и рекрутирующего НК-клетки домена (анти-NKG2А/анти-NKG2D). Дополнительные варианты могут состоять из маскирующих последовательностей САР, расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, а также точно-мутированных рекрутирующих последовательностей, которые не обладают активностью связывания с конкретным рекрутером и служат отрицательными контролями для вариантов Tribody/Protribody.

[0168] Методы: связывание антительных конструктов Tribody с антигенами по данным твердофазного ИФА: целевой белок h5Т4-His (кат. № 19845-H08Н, поставщик Sino Biological) разводили в PBS до конечной концентрации 0,3 мкг/мл и наносили по 100 мкл/лунка на планшет для твердофазного ИФА (кат. № 9018, поставщик Corning). Инкубировали в течение ночи при 4 °С. Планшеты блокировали 250 мкл 1%-го BSA в PBST в течение 1 ч при 37 °С. Промывали PBST 4 раза. Все промывки выполняли с использованием Biotek (Elx 405). Все антитела набора Tribody разводили до 400 нМ и получали 4-кратные последовательные разведения (12 точек, включая точку 0). Добавляли по

100 мкл/лунка разбавленных антительных конструкторов на планшет, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Промывали PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка антитела к легкой цепи каппа человека, конъюгированного с HRP (1 : 10 000), и инкубировали в течение 0,5 ч при 37 °С. Промывали PBST 4 раза. Добавляли по 100 мкл/лунка субстрата ТМБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли по 100 мкл/лунка 1N HCl для завершения реакции. Планшеты считывали с использованием сканера для планшетов для твердофазного ИФА при длине волны 450 нм (прибор SpectraMax M5e). Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 5, используя нелинейную регрессию (аппроксимацию кривой) для зависимости log (агонист) против ответа, где агонист представляет собой концентрацию антитела (нМ), а ответ представляет собой значение оптической плотности (OD).

[0169] Результаты: экспрессированные триспецифические конструкторы, состоящие из гуманизованных последовательностей 5Т4, анализировали на эффективность связывания с белком 5Т4. Для гуманизованных последовательностей 5Т4 (5Т4_IM11-20 или 5Т4_IM29-58) наблюдали широкий диапазон значений EC50 с белком 5Т4 человека (Фиг. 16). Большинство вариантов демонстрируют более низкие значения EC50, чем исходный негуманизованный клон.

[0170] Вывод: как показано на Фиг. 16А–16Н, связывание антитела Tribody, которое содержит гуманизованные последовательности 5Т4, было подтверждено в некоторых гуманизованных конструкторах, тогда как другие конструкторы имели низкие значения EC50, а некоторые конструкторы не связывались с рекомбинантным антигенным белком 5Т4. Тот факт, что разные каркасы приводили к разным аффинностям связывания по отношению к h5Т4, может объясняться совместимостью CDR с конкретным каркасом, что может

приводить к структурным нарушениям, которые препятствуют правильной ориентации CDR.

ПРИМЕР 6

Связывание полностью гуманизованных триспецифических антительных конструкторов с клетками по данным FACS

[0171] *Цель:* исследовать эффективность связывания гуманизованных антительных конструкторов Tribody с клетками, экспрессирующими мембраносвязанный эндогенный 5Т4 (NCI-H226) или эктопический 5Т4 (клетки СНО, сверхэкспрессирующие 5Т4), по данным FACS. Эти конструкторы состояли из домена ScFv к ТАА (гуманизованное антитело к 5Т4), рекрутирующего Т-клетки домена (Fab к CD3ε) и рекрутирующего НК-клетки домена (анти-NKG2A/анти-NKG2D). Дополнительные варианты могут состоять из маскирующих последовательностей CAP, расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, а также точно-мутированных рекрутирующих последовательностей, которые не обладают активностью связывания с конкретным рекрутером и служат отрицательными контролями для вариантов Tribody/Protibody.

[0172] *Методы:* связывание антительных конструкторов Tribody с клетками по данным FACS. Суспензионные культивируемые клетки собирали напрямую, а прикрепленные клетки отделяли с использованием фермента TrypLE Express Enzyme (кат.: 12604-013, поставщик Life technologies). Центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Клетки суспендировали в концентрации 2×10^6 /мл в буфере для FACS (2% FBS в PBS) и наносили по 100 мкл/лунка клеточной суспензии на планшет (кат. № 3799, поставщик Corning). Центрифугировали планшеты при 2000 об/мин в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунка антител набора Tribody (400 нМ исходная, 4-кратное разведение, 8 точек, включая точку

0) и планшет инкубировали в течение 60 мин при 4 °С. Центрифугировали планшет при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Затем промывали клетки 3 раза 170 мкл буфера для FACS. Ресуспендировали клетки при 100 мкл/лунка со вторичным антителом (козье антитело к человеческому Ig-Fab-FITC, кат. № 2085-02, Southern biotech) в разведении 1 : 400 и инкубировали планшет в течение 30 мин при 4 °С в темноте. Центрифугировали планшет при 2000 об/мин, 4 °С в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. Затем клетки промывали 3 раза буфером для FACS и анализировали образец с помощью FACS verse. Интенсивность флуоресценции красителя измеряли с помощью проточного цитометра (BD, FACSVerse). Вычисляли среднегеометрическую интенсивность флуоресценции (GMFI; медианная интенсивность флуоресценции (MFI)) для окрашивания набора антител (программное обеспечение BD FACSuite). С использованием программного обеспечения GraphPad Prism были получены кривые доза — ответ и вычислены значения EC50 для связывания триспецифических вариантов.

[0173] Результаты: экспрессированные триспецифические конструкции, состоящие из гуманизованного антитела к 5Т4, анализировали и подтверждали эффективность связывания с клетками CHO, сверхэкспрессирующими 5Т4 (Фиг. 17А–17Н), при отсутствии связывания с родительскими клетками CHO (данные не показаны). Связывание также подтверждали на клетках NCI-H226, экспрессирующих эндогенный 5Т4 (Фиг. 17I–17O). Данные указывают на широкий диапазон значений EC50, наблюдаемых для различных вариантов. В частности, для вариантов Tribody регистрировали значения EC50 1,4 нМ для IM-1178 и 2,3 нМ для IM-1222 на клетках CHO, сверхэкспрессирующих 5Т4, и значения EC50 1,24 нМ для IM-1178 и 3,9 нМ для IM-1222 на клетках NCI-H226. Выбранные конструкции также оценивали на связывание с клетками, сверхэкспрессирующими NKG2A, и подтверждали, что гуманизованные

последовательности 5Т4 не влияли на связывание с NKG2А (данные не показаны).

[0174] *Вывод:* как показано на **Фиг. 17А–17О**, связывание вариантов Tribody, которые содержат гуманизированные последовательности 5Т4, с клетками, экспрессирующими 5Т4, было подтверждено в некоторых гуманизированных конструктах, тогда как другие конструкты имели низкие значения EC50, а некоторые конструкты не обладали связыванием. Выбранный конструкт IM-1222, который соответствует последовательности 5Т4_IM53, дополнительно характеризовали на эффективность *in vitro* и *in vivo*.

ПРИМЕР 7

*Функциональная оценка *in vitro* полностью гуманизированного антительного конструкта Tribody*

[0175] *Цель:* оценить *in vitro* дозозависимую опосредованную Т-клетками цитотоксичность вариантов Tribody/ProTribody на клетках рака молочной железы и рака легкого (MDA-MB-231 и NCI-H226 соответственно).

[0176] *Методы:* анализ цитотоксичности по лактатдегидрогеназе (LDH). Варианты Tribody и ProTribody анализировали на способность индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность на раковых клетках, экспрессирующих 5Т4. Вкратце Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения человеческих Т-клеток EasySep Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL, кат.: 17951). Доводили концентрацию клеток-мишеней до 2×10^5 /мл буфером для анализа (чистый RPMI 1640, Gibco, кат. № 10491, плюс 5% FBS) и добавляли по 50 мкл в лунки круглодонного 96-луночного планшета (кат. № 3799, Corning). Доводили концентрацию эффекторных клеток (выделенные Т-клетки или мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) от ALLCELLS) до 2Е6/мл буфером для анализа и добавляли по 50 мкл в лунки в соотношении Е : Т 10 : 1. Затем добавляли по 100 мкл/лунка 2-кратных

разведений антител и перемешивали в достаточной степени. Инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 24 ч. Центрифугировали планшет при 300 g в течение 5 мин и собирали супернатант. Высвобождение LDH анализировали с помощью набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, G1780). Добавляли по 20 мкл лизирующего раствора (10*) в лунку Max, в достаточной степени перемешивали и инкубировали при 37 °C в течение 45 мин. Затем переносили по 50 мкл аликвот из всех тестовых и контрольных лунок в новый 96-луночный планшет с плоским прозрачным дном (кат. № 3599, Corning). В каждую лунку добавляли по 50 мкл реагента CytoTox. Планшеты защищали от света и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Наконец, добавляли по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку 96-луночного планшета. Регистрировали поглощение при 490 нм или 492 нм в течение 1 ч после добавления стоп-раствора. Результат расчета таков: % цитотоксичности = (эксперимент - только E - только T) / (T Max - только T) × 100).

[0177] Результаты: при использовании лактатдегидрогеназного анализа опосредованная Т-клетками цитотоксичность была достигнута для клеток NCI-H226 (Фиг. 18А) или MDA-MB-231 (Фиг. 18В) соответственно со значениями EC50 0,02 нМ для Tribody IM-1222 (квадраты) и 0,38 нМ для Tribody IM-1062 (круги).

[0178] Вывод: в анализах цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, две раковые клеточные линии подвергались уничтожению в присутствии Tribody IM-1062 и IM222 с более высокой эффективностью в случае IM-1222, которое представляет собой гуманизированную последовательность 5T4_IM-53, полученную из mAt016, описанного ранее.

ПРИМЕР 8

Эффективность in vivo в модели ксенотрансплантата на мышцах NSG

[0179] *Цель:* исследовать эффективность Tribody IM-1222 5T4_IM53-CD3-NKG2A с человеческими МКПК на модели с прививкой NCI-H226 мышам NCG и исследовать ингибирование роста опухоли, индуцированное Tribody IM-1222 в гуманизированной мышинной модели.

[0180] *Методы:* *in vivo анализ ксенотрансплантата.* клетки NCI-H226 (рак легкого человека, ATCC, кат. № CRL-5826, партия № 58094746) культивировали *in vitro* в качестве монослойной культуры в RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в воздухе. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли. Самки мышей NCG, 6–7 недель, весом приблизительно 19–21 г были приобретены у GemPharmatech Co., LTD. Мышам подсаживали подкожно в правый бок 5×10^6 клеток NCI-H226 в 0,2 мл смеси (исходная среда: Matrigel = 100 мкл : 100 мкл) для развития опухоли (в день 0). На 7-е сутки мышам вводили в/в 1×10^7 человеческих МКПК от двух здоровых доноров. В каждой группе половине животных вводили МКПК от одного донора, и половине животных — от второго донора. Лечение в целях исследования эффективности против опухоли начинали, когда опухоли достигали среднего размера ~150 мм³ приблизительно через одну неделю после подсадки клеток, когда матригель полностью рассасывался. Мышам ежедневно вводили (в/б) дозу 20 мкг/кг. Размеры опухолей измеряли дважды в неделю в двух направлениях с использованием штангенциркуля; объем выражали в мм³ с использованием формулы: $V = 0,5 a \times b^2$, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Затем эти размеры опухолей использовали для расчета ингибирования роста опухоли (TGI). В частности, в исследование входили 10 животных, которых использовали в качестве группы, получавшей только несущую среду, буфер TT2 (200 мМ аргинина, 137 мМ янтарной кислоты, 5% трегалозы, 0,05% Tween-80, pH 5,0, 150 мМ NaCl), и две дополнительных группы по 6 мышей, которым вводили IM-1062 или IM-1222.

[0181] *Результаты:* на **Фиг. 19** показан объем опухоли (мм³) у мышей, получавших Tribody IM-1222 (круги), мышей, получавших Tribody IM-1062 (квадраты) и контроль — буфер ТТ2 (треугольники). Как показано на **Фиг. 19**, введение Tribody значительно уменьшало размер опухоли по сравнению с контрольными образцами и со значимым TGI 84% в день 11 для IM-1222 и 44% в день 18.

[0182] *Вывод:* эффективность Tribody IM-1222, представляющего собой гуманизированную последовательность 5T4_IM53, полученную из mAt016, продемонстрирована в моделях с ксенотрансплантацией *in vivo* с ответами в диапазоне от ~40–84% TGI.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к 5Т4, содержащее три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8; или

(ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16; или

(iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24; или

(iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32; или

(v) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40; или

(vi) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48; или

(vii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56; или

(viii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

2. Антитело к 5Т4 по п. 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем указанные вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат аминокислотные

последовательности с SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76; SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86; SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102; SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID NO: 125–126; SEQ ID NO: 127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152.

3. Антитело к 5T4 по п. 1 или 2, причем антитело представляет собой IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, минитело, диатело, триатело, нанотело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело или однодоменное антитело.

4. Антитело к 5T4 по п. 3, причем указанный IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Композиция, содержащая антитело к 5T4 по любому из пп. 1–4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Композиция по п. 5, причем антитело к 5T4 содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8; или

- (ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16; или
- (iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24; или
- (iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32; или
- (v) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40; или
- (vi) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48; или
- (vii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56; или
- (viii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

7. Композиция по п. 6, причем антитело к 5T4 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76; SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86; SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102;

SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID NO: 125–126; SEQ ID NO: 127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152.

8. Выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к 5T4 по п. 1 или 2.

9. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п. 8.

10. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 9.

11. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий стадию введения субъекту композиции, содержащей эффективное количество антитела к 5T4 по любому из пп. 1–4.

12. Способ по п. 11, в котором заболевание представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), вирусную инфекцию или бактериальную инфекцию.

13. Способ по п. 11, в котором антитело к 5T4 содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

(i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2–4, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 6–8; или

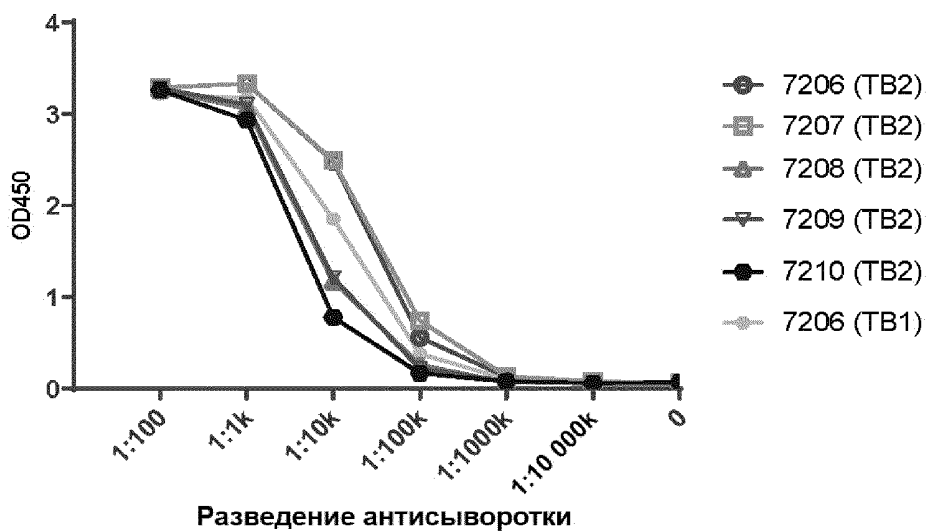
(ii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10–12, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 14–16; или

- (iii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 18–20, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 22–24; или
- (iv) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 26–28, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 30–32; или
- (v) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 34–36, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 38–40; или
- (vi) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42–44, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 46–48; или
- (vii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50–52, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 54–56; или
- (viii) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58–60, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 62–64.

14. Способ по п. 13, в котором антитело к 5T4 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем указанные переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 и 5; SEQ ID NO: 9 и 13; SEQ ID NO: 17 и 21; SEQ ID NO: 25 и 29; SEQ ID NO: 33 и 37; SEQ ID NO: 41 и 45; SEQ ID NO: 49 и 53; или SEQ ID NO: 57 и 61; SEQ ID NO: 65–66; SEQ ID NO: 67–68; SEQ ID NO: 69–70; SEQ ID NO: 71–72; SEQ ID NO: 73–74; SEQ ID NO: 75–76; SEQ ID NO: 77–78; SEQ ID NO: 79–80; SEQ ID NO: 81–82; SEQ ID NO: 83–84; SEQ ID NO: 85–86; SEQ ID NO: 87–88; SEQ ID NO: 89–90; SEQ ID NO: 91–92; SEQ ID NO: 93–94; SEQ ID NO: 95–96; SEQ ID NO: 97–98; SEQ ID NO: 99–100; SEQ ID NO: 101–102; SEQ ID NO: 103–104; SEQ ID NO: 105–106; SEQ ID NO: 107–108; SEQ ID NO: 109–110; SEQ ID NO: 111–112; SEQ ID NO: 113–114; SEQ ID NO: 115–116; SEQ ID NO: 117–118; SEQ ID NO: 119–120; SEQ ID NO: 121–122; SEQ ID NO: 123–124; SEQ ID

NO: 125–126; SEQ ID NO: 127–128; SEQ ID NO: 129–130; SEQ ID NO: 131–132; SEQ ID NO: 133–134; SEQ ID NO: 135–136; SEQ ID NO: 137–138; SEQ ID NO: 139–140; SEQ ID NO: 141–142; SEQ ID NO: 143–144; SEQ ID NO: 145–146; SEQ ID NO: 147–148; SEQ ID NO: 149–150; или SEQ ID NO: 151–152.

п/к



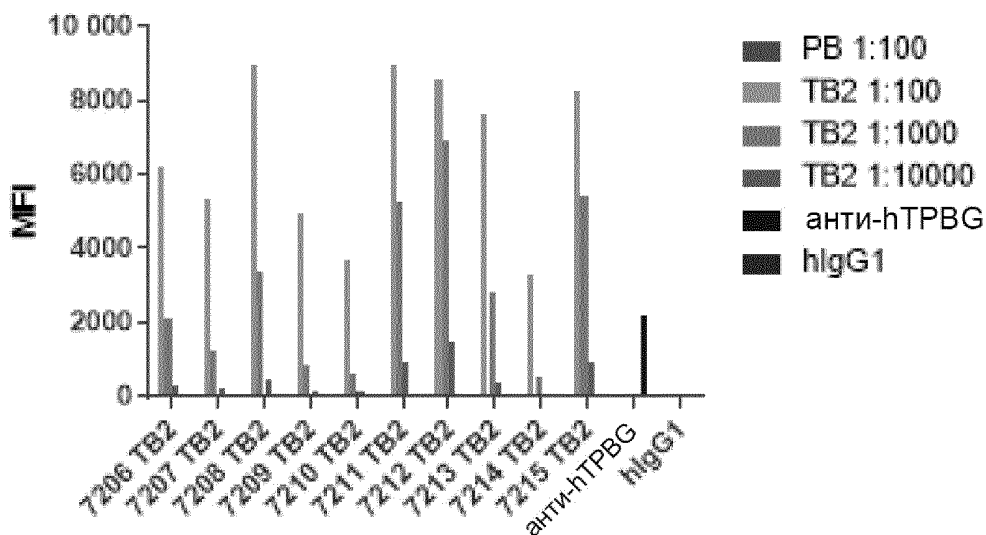
Фиг. 1А

в/б



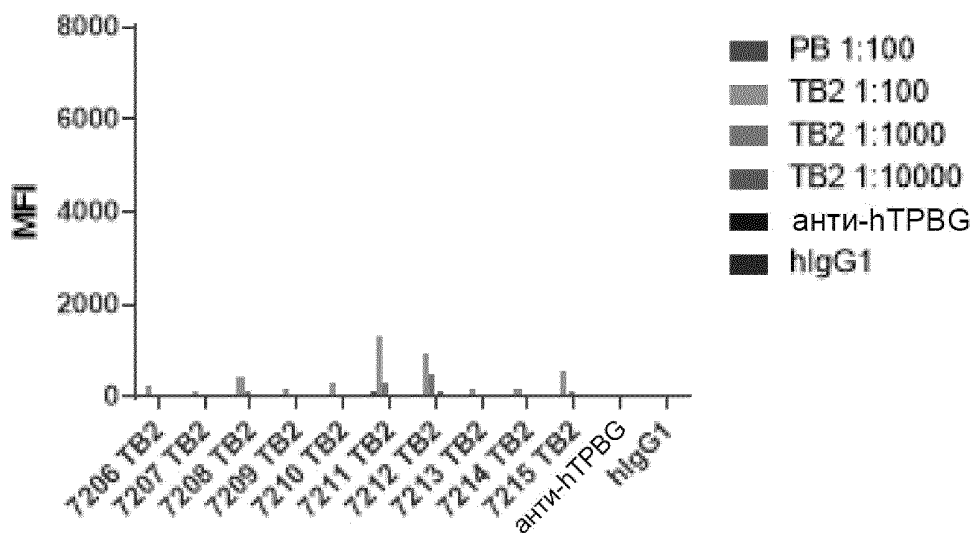
Фиг. 1В

СНО, сверхэкспрессирующие 5Т4



Фиг. 1С

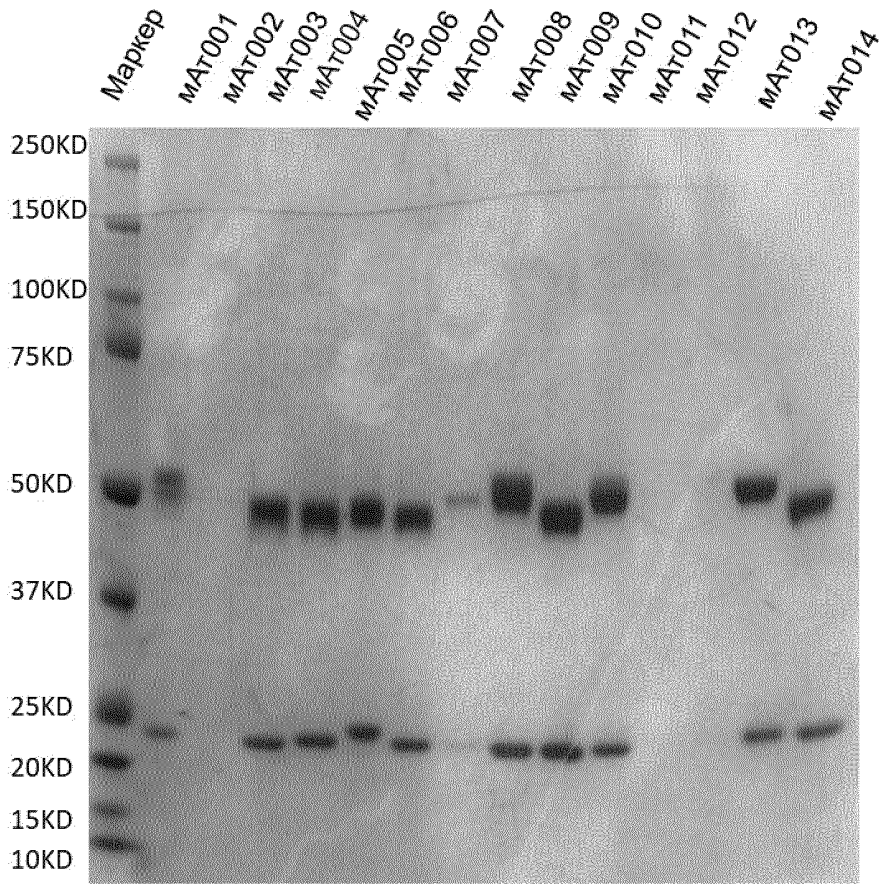
Родительские клетки СНО



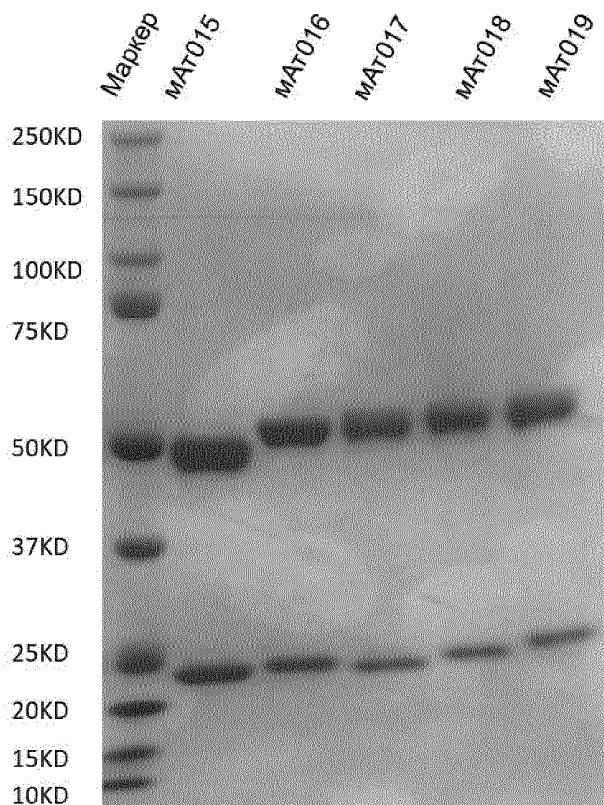
Фиг. 1D

мАт №	Идентификатор клона
1	2F1G12
2	6H6D3
3	15C12F10
4	16G3B1
5	24A10B7
6	30G2F11
7	33D3C7
8	37F3G3
9	38C3H3
10	38F10D10
11	38G8D5
12	38G10G3
13	23D2E9C6
14	33H6C3E7
15	37E7G4G2
16	20E12E6
17	19G10H2C6
18	20B11D7D6
19	40F9D10A3

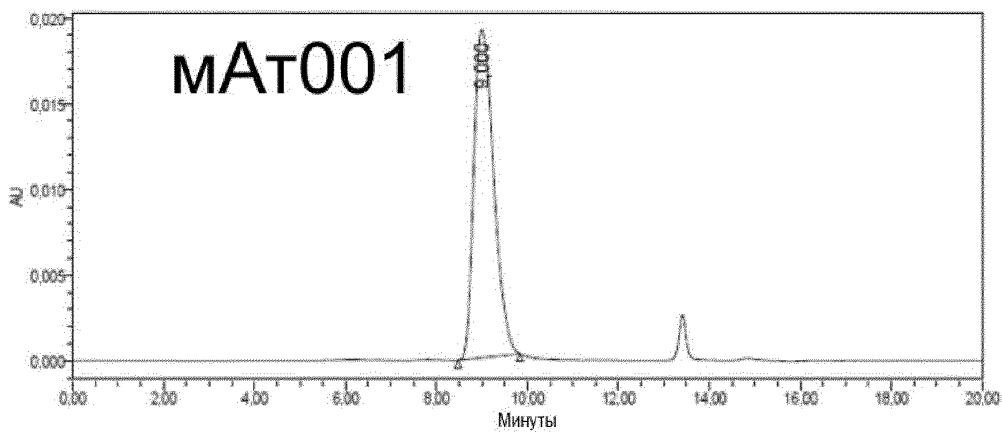
Фиг. 2



Фиг. 3А

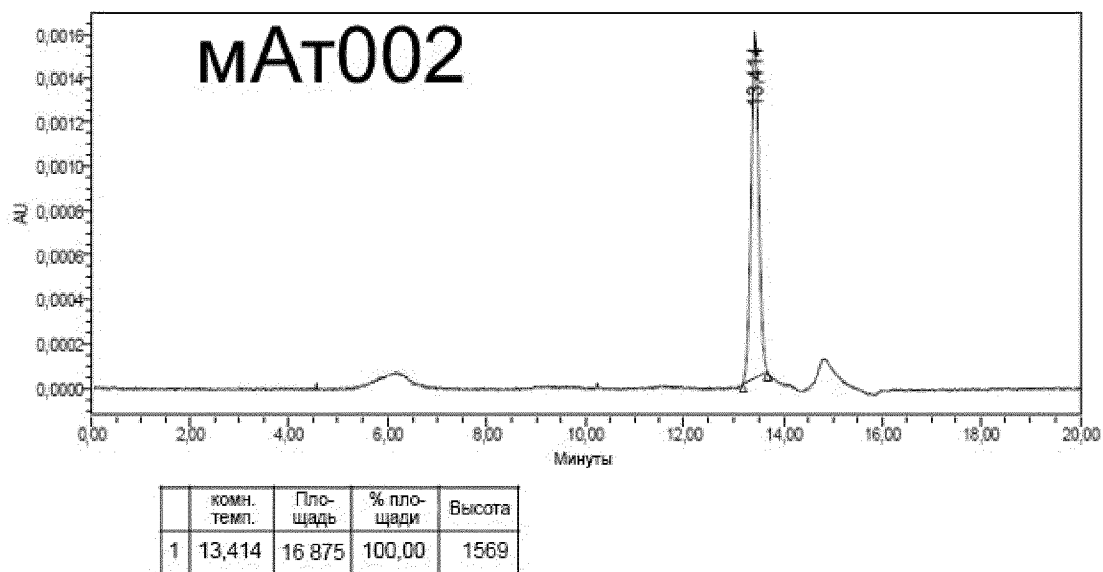


Фиг. 3В

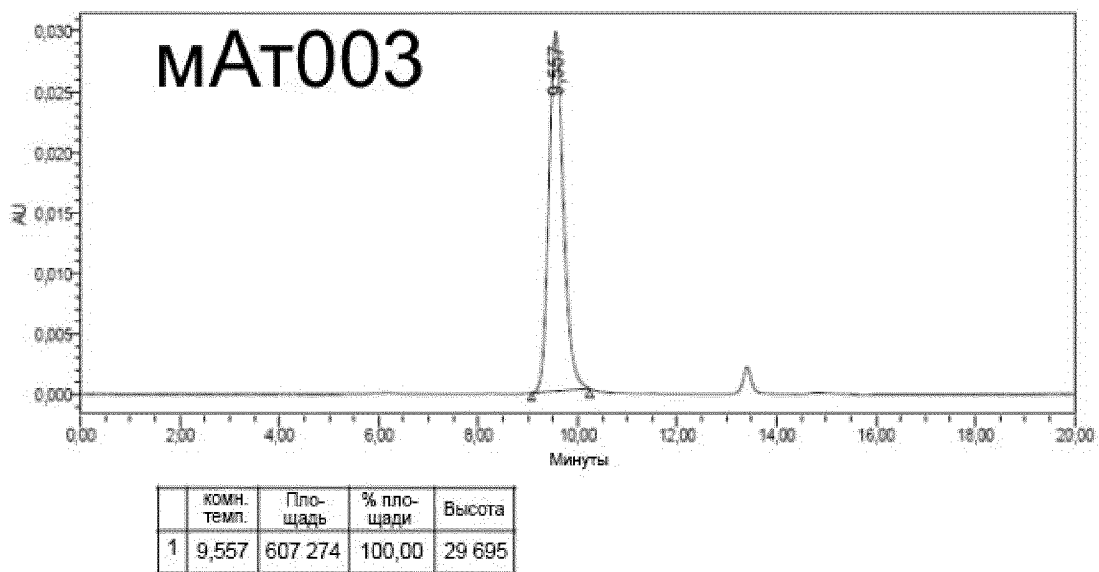


	комн. темп.	Площадь	% площади	Высота
1	9,000	581.198	100,00	19.117

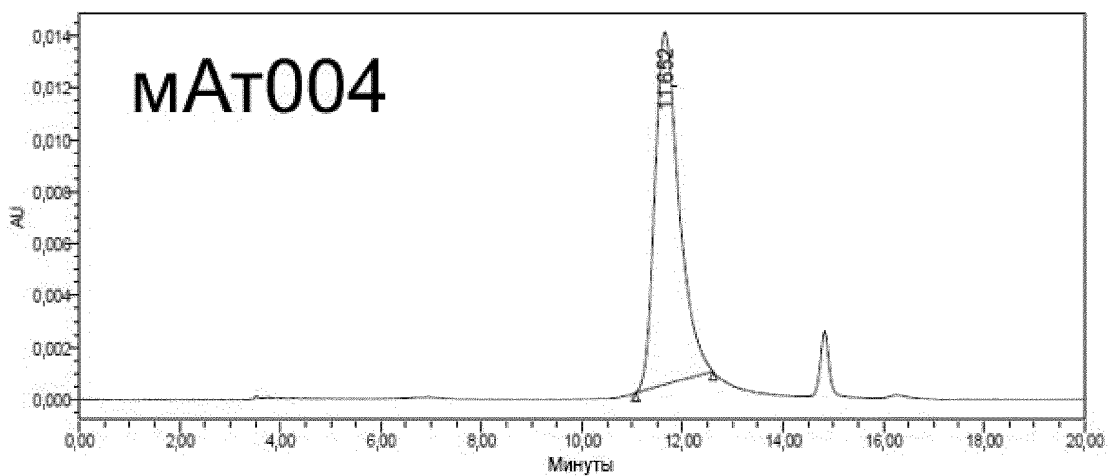
Фиг. 4А



Фиг. 4В

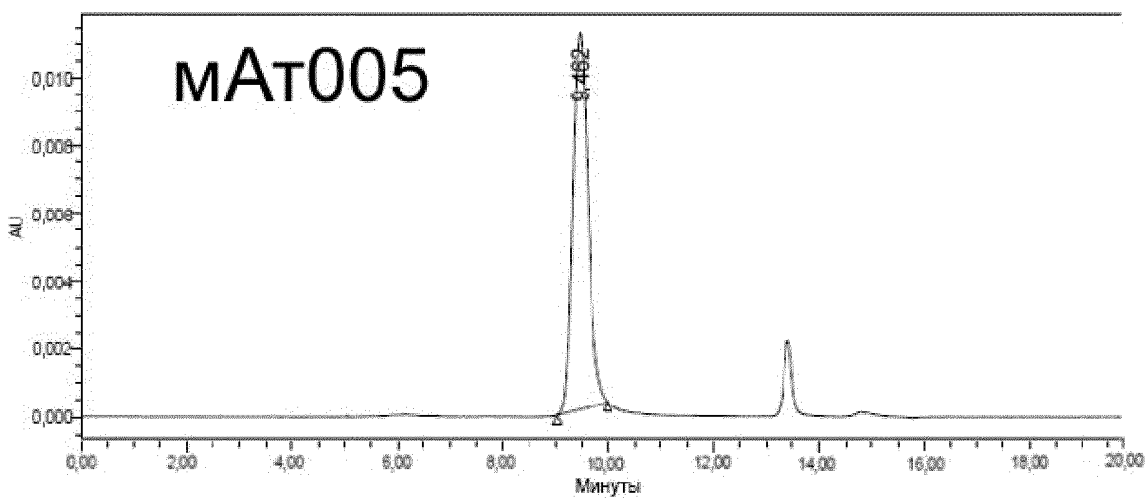


Фиг. 4С



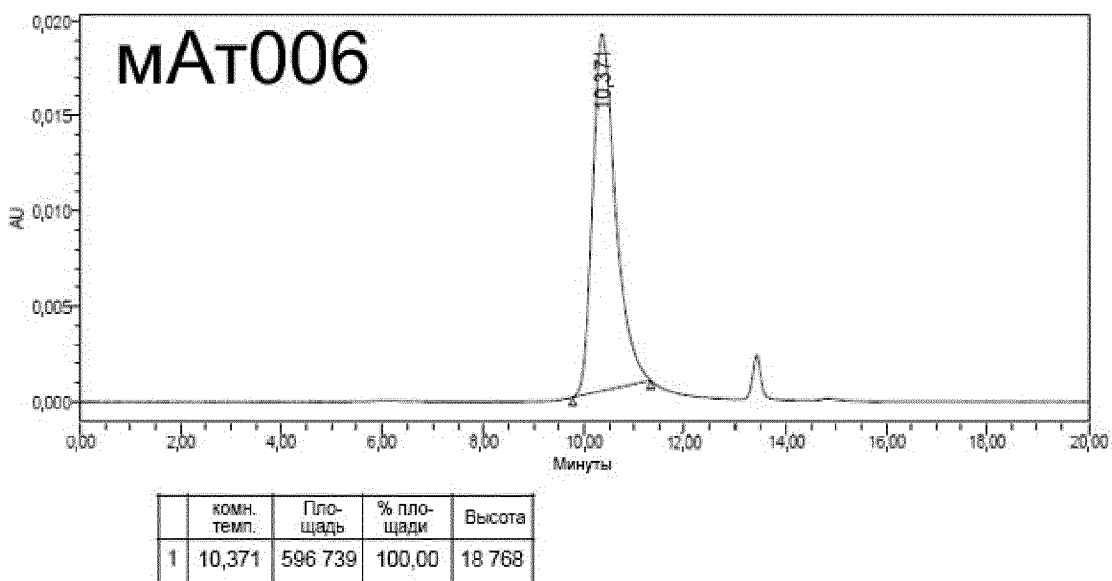
	комн. темп.	Площадь	% площади	Высота
1	11,652	453 314	100,00	13 554

Фиг. 4D

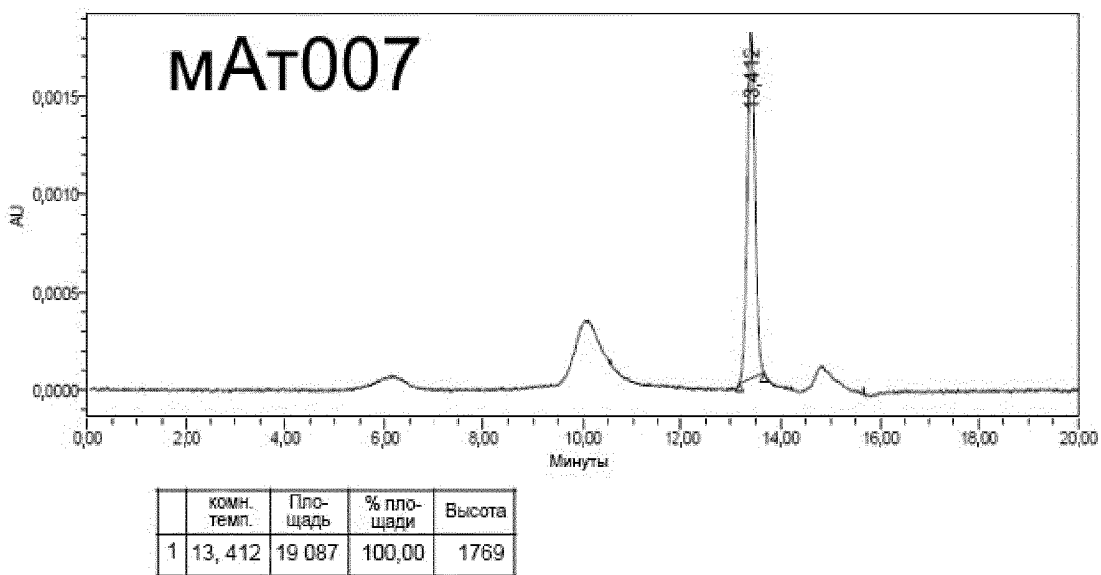


	комн. темп.	Площадь	% площади	Высота
1	9,462	222 216	100,00	11 064

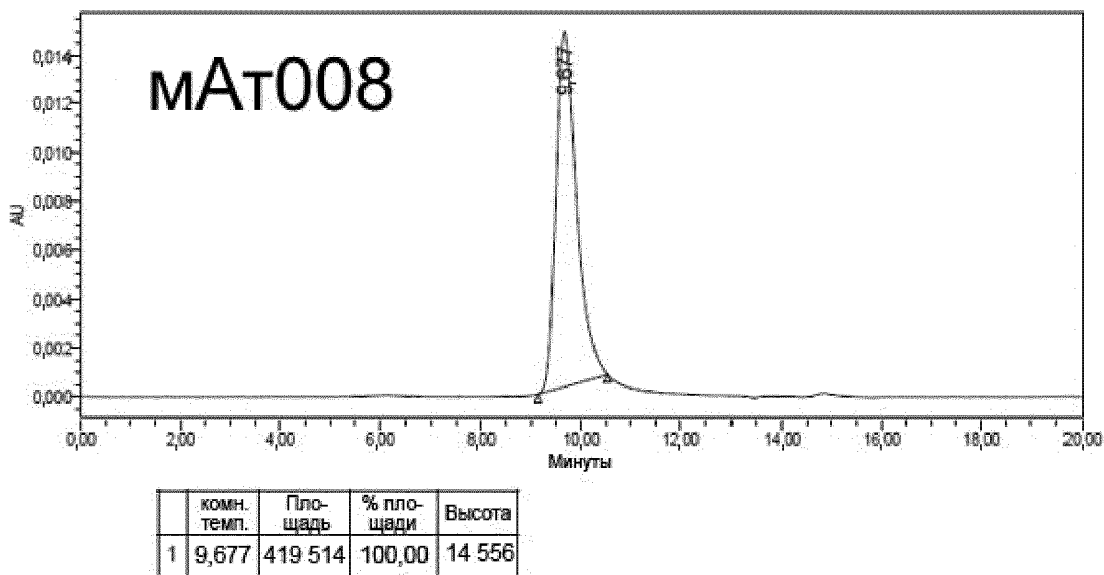
Фиг. 4E



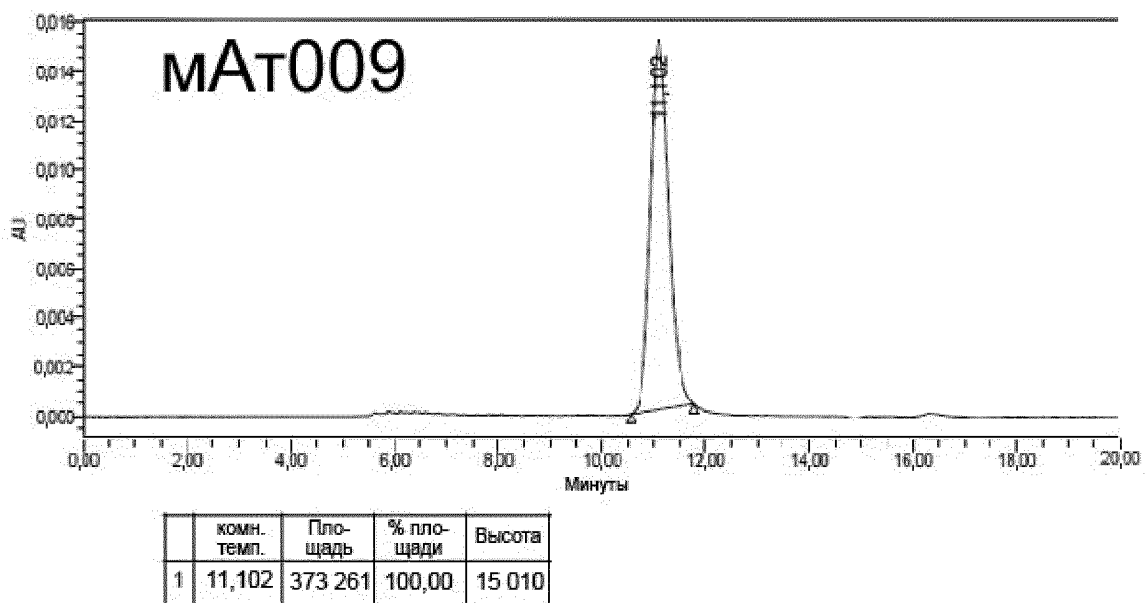
Фиг. 4F



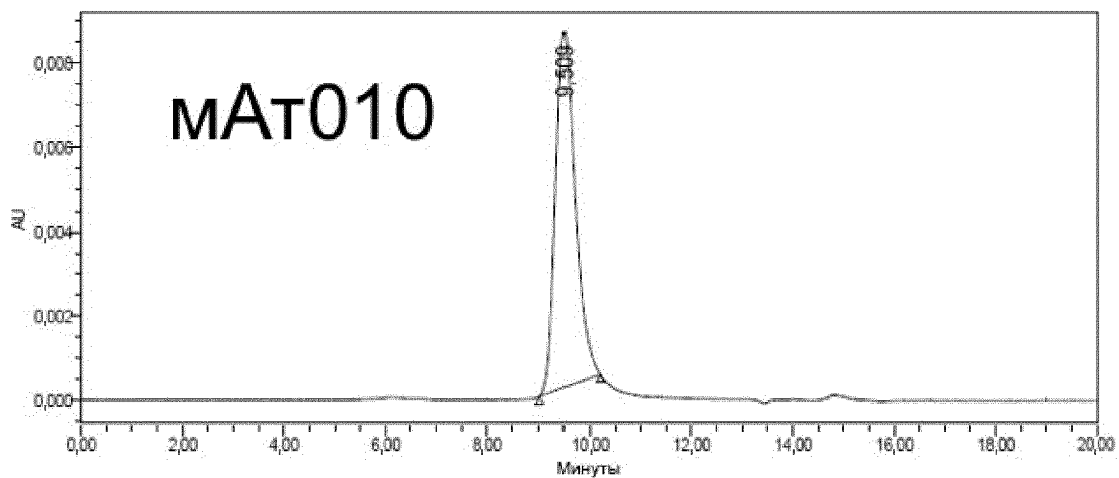
Фиг. 4G



Фиг. 4H

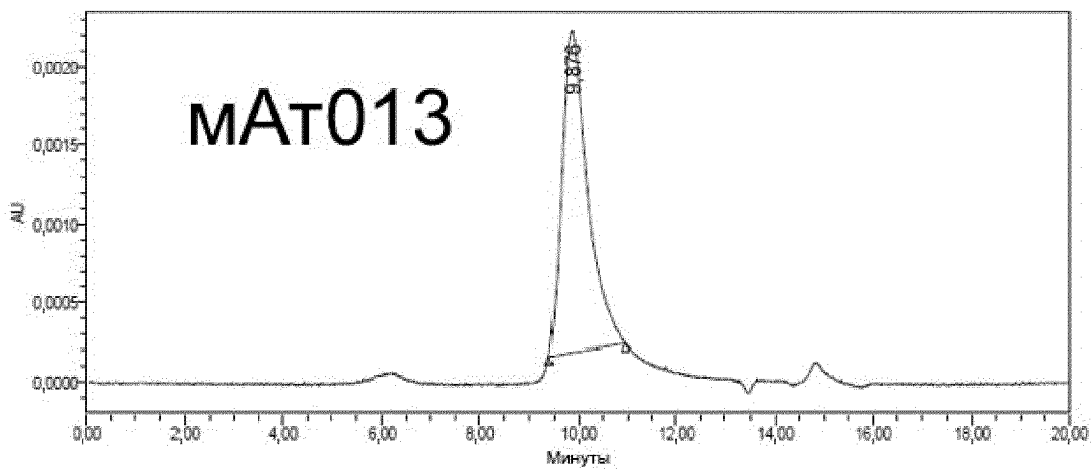


Фиг. 4I



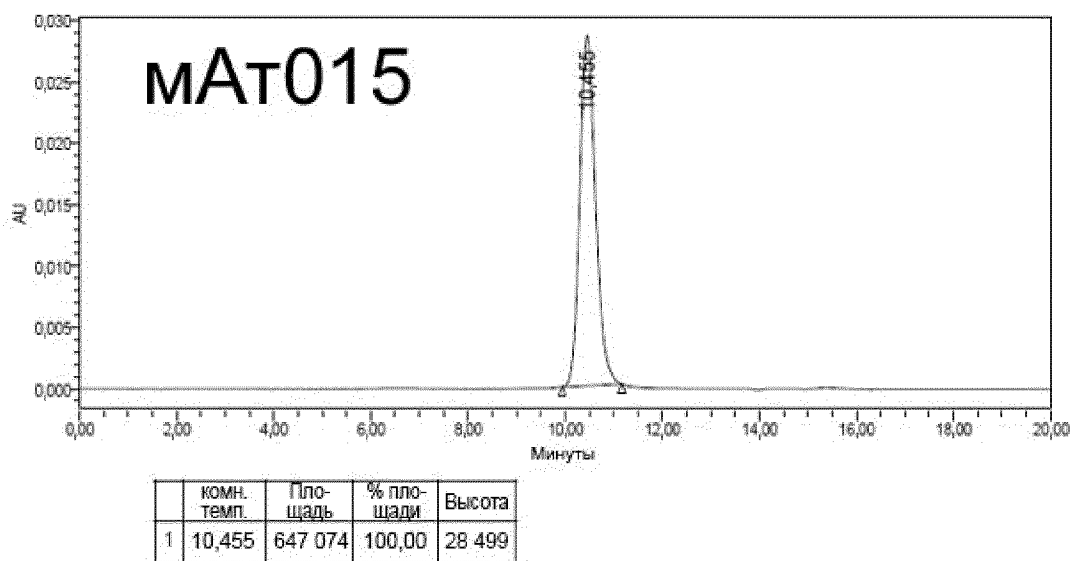
	комн. темп.	Площадь	% площади	Высота
1	9,509	216 934	100,00	8438

Фиг. 4J

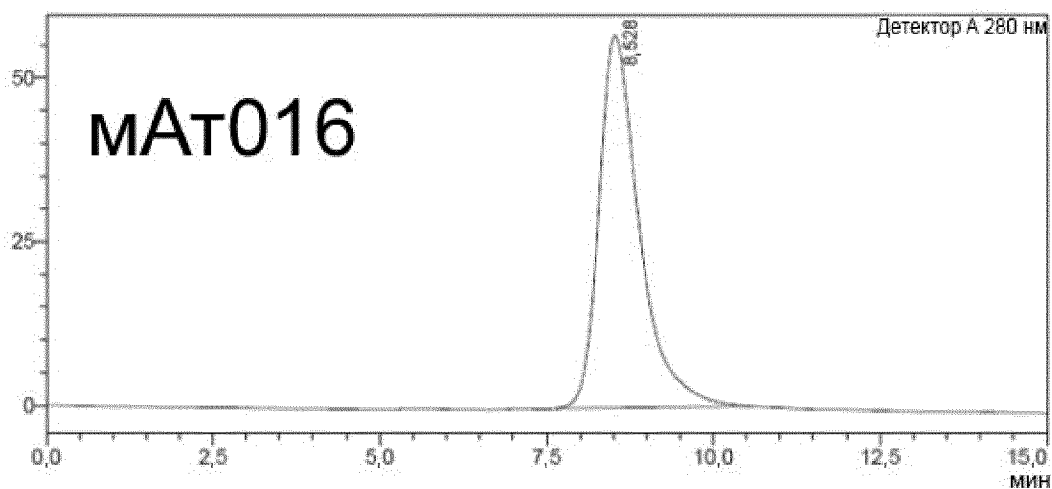


	комн. темп.	Площадь	% площади	Высота
1	9,876	74 498	100,00	2048

Фиг. 4K



Фиг. 4L

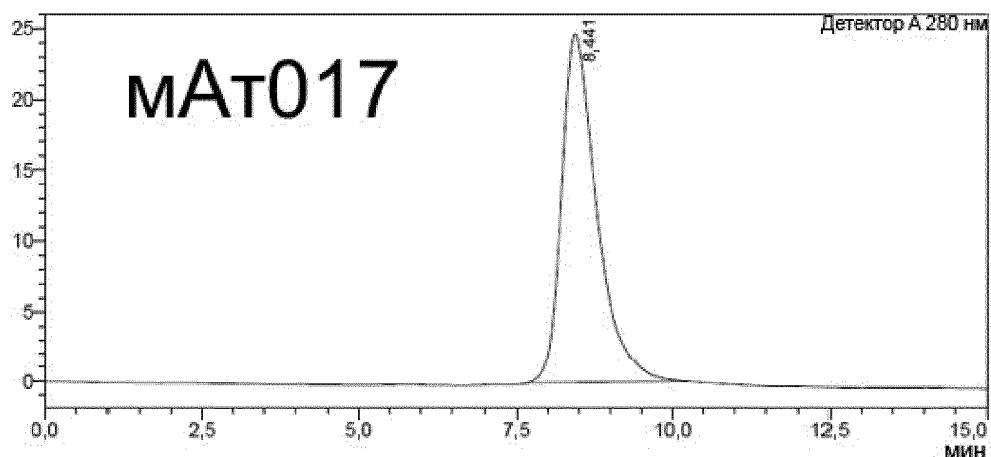


<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм

Пик №	Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
1	8,528	2 400 659	100,000	56 807	100,000
Всего		2 400 659	100,000	56 807	100,000

Фиг. 4М

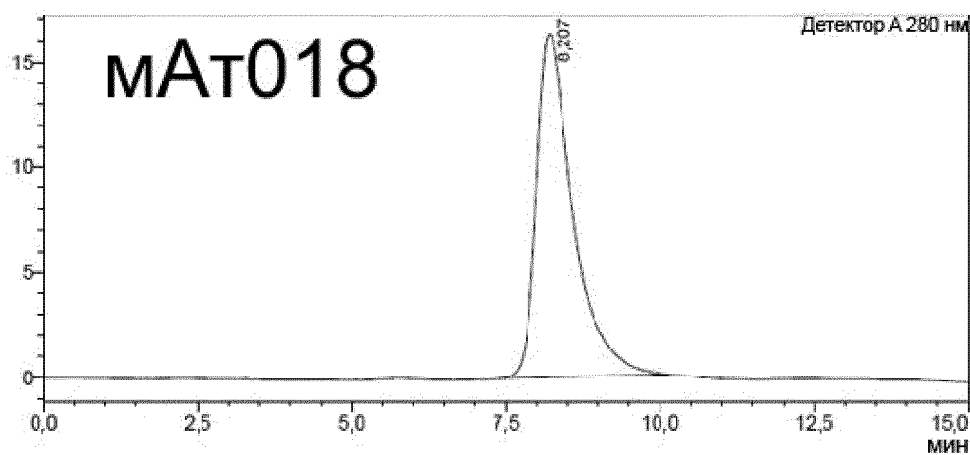


<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм

Пик №	Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
1	8,441	975 895	100,000	24 708	100,000
Всего		975 895	100,000	24 708	100,000

Фиг. 4N

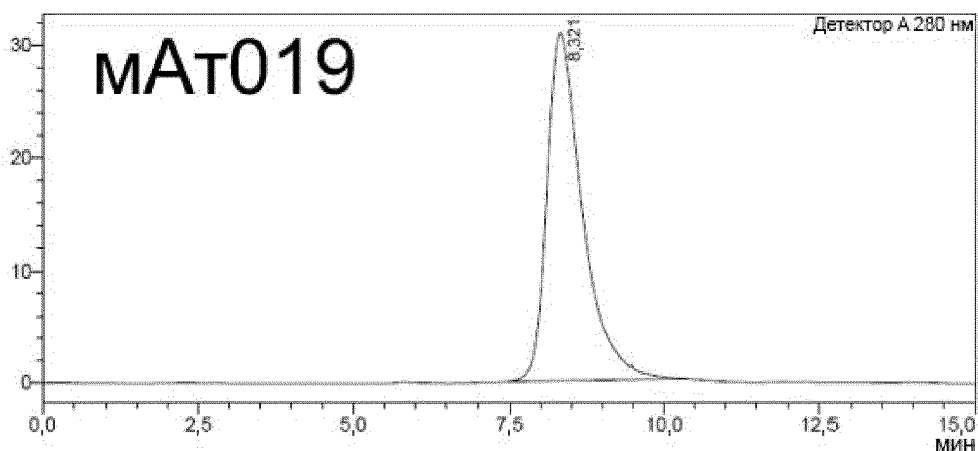


<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм

Пик №	Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
1	8,207	665 723	100,000	16 293	100,000
Всего		665 723	100,000	16 293	100,000

Фиг. 4O

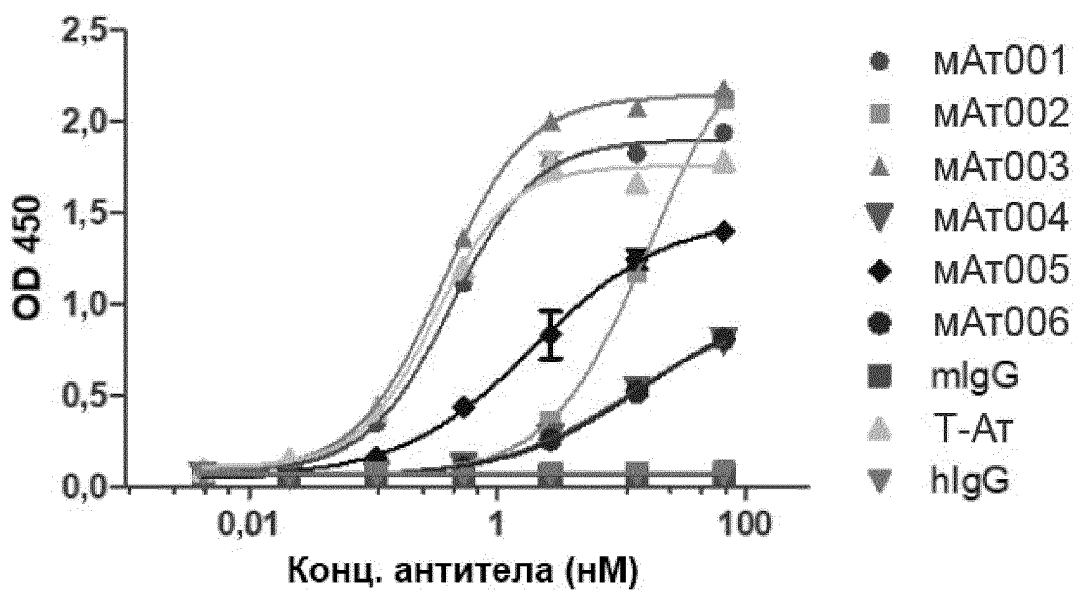


<Таблица пиков>

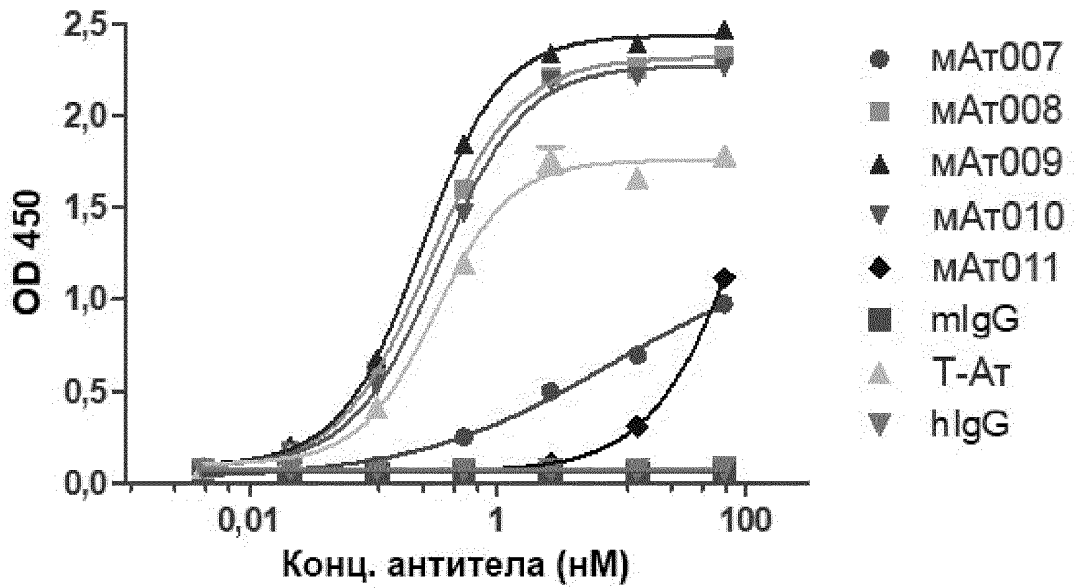
Детектор А 280 нм

Пик №	Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
1	8,321	1 244 619	100,000	30 902	100,000
Всего		1 244 619	100,000	30 902	100,000

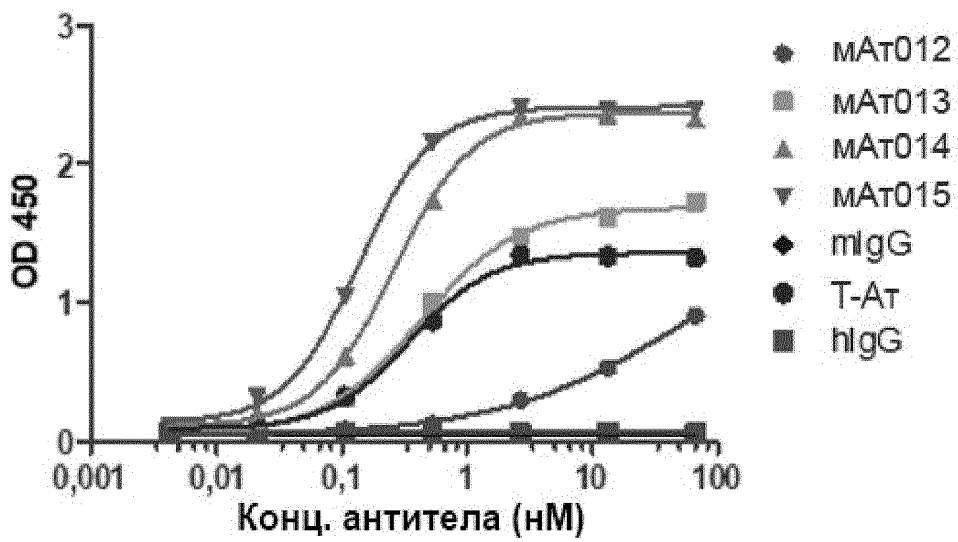
Фиг. 4Р



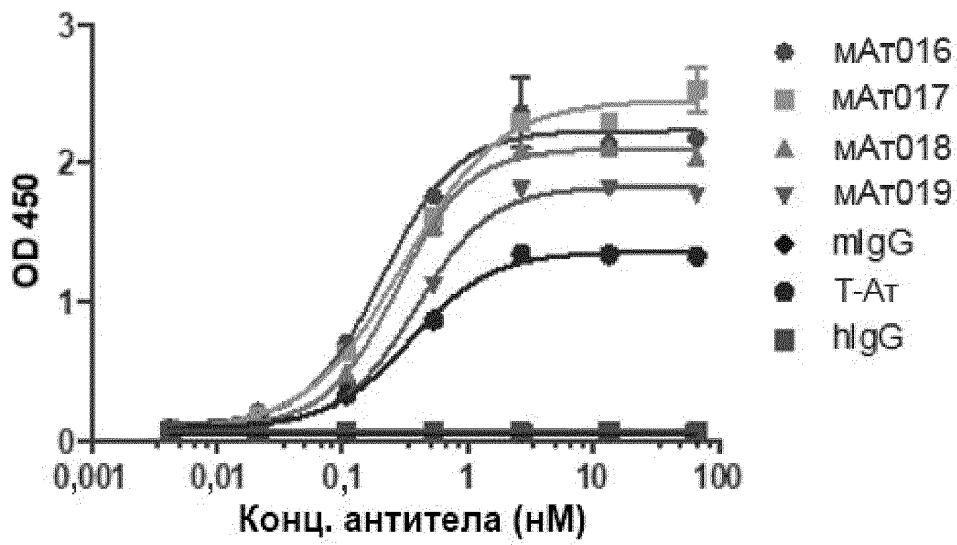
Фиг. 5А



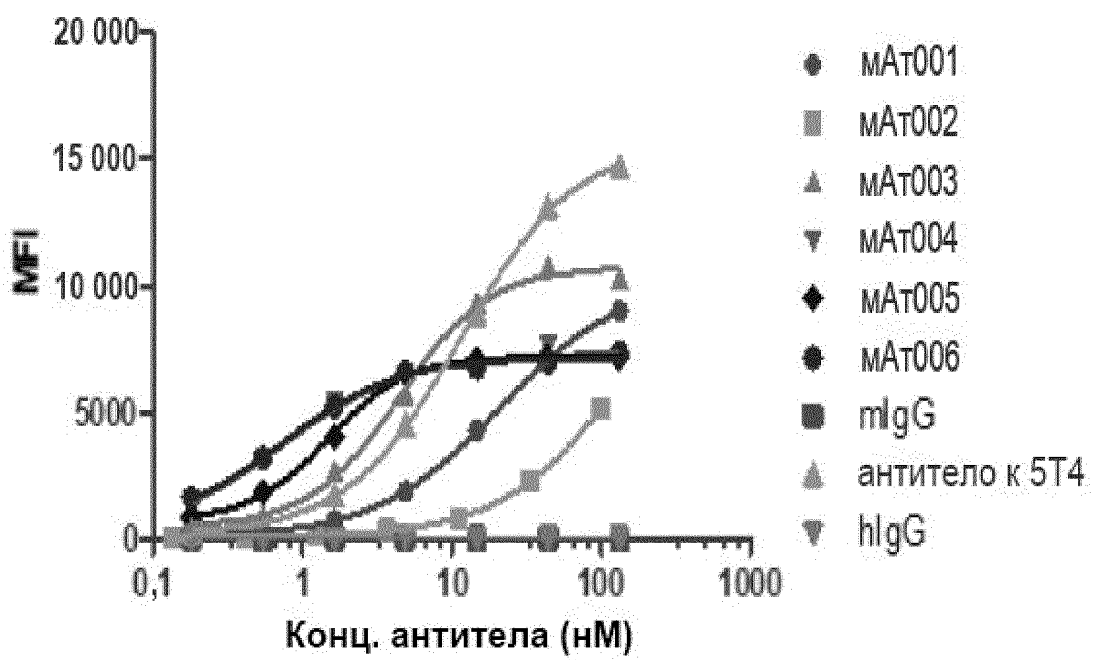
Фиг. 5В



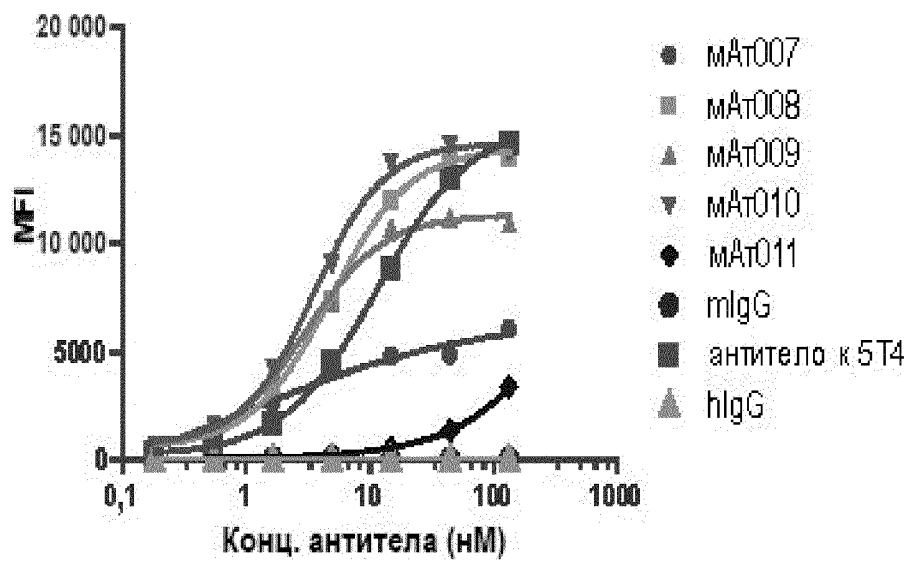
Фиг. 5С



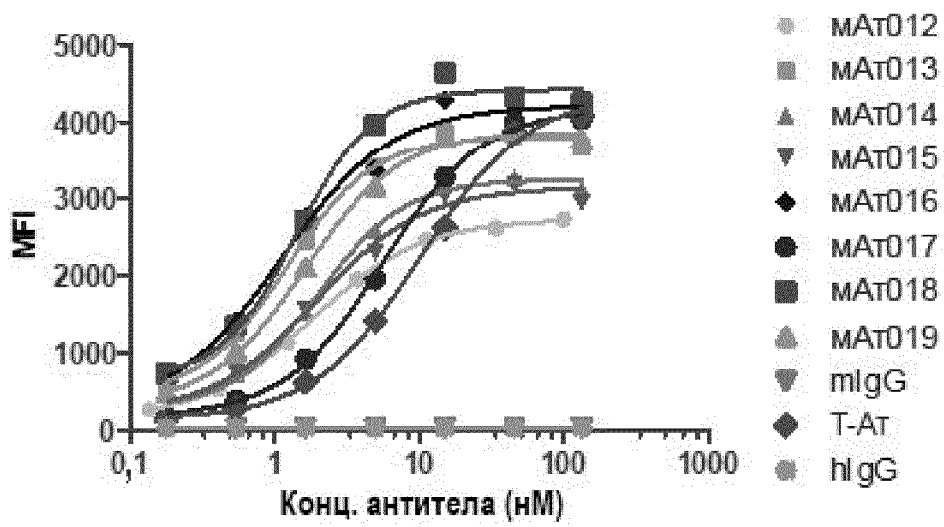
Фиг. 5D



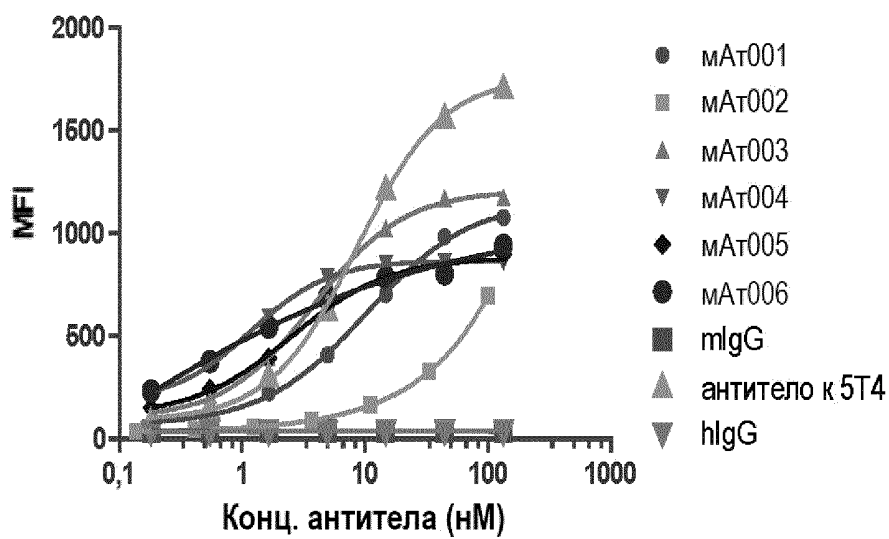
Фиг. 6A



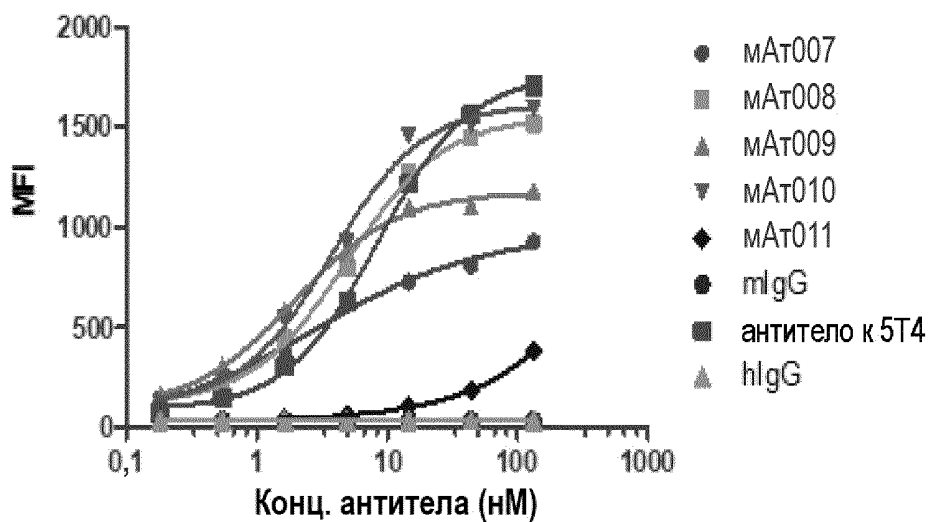
Фиг. 6В



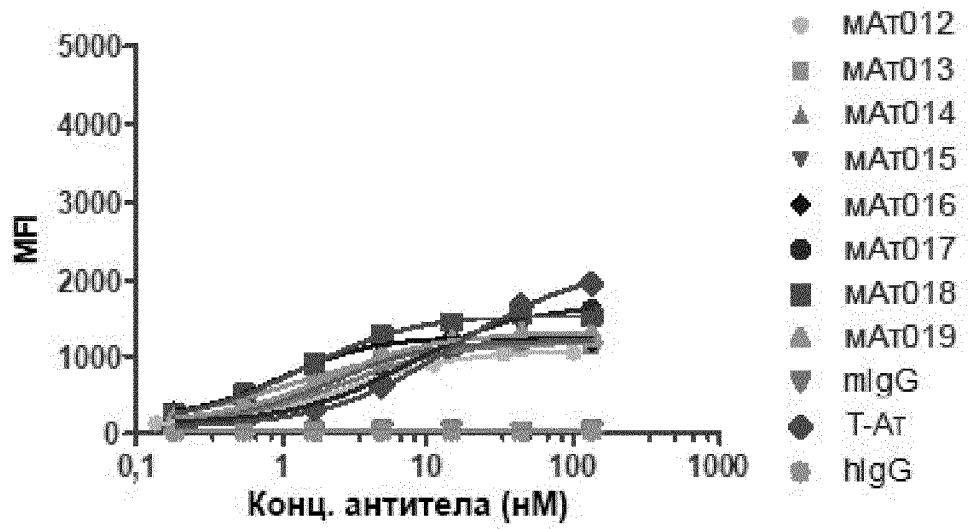
Фиг. 6С



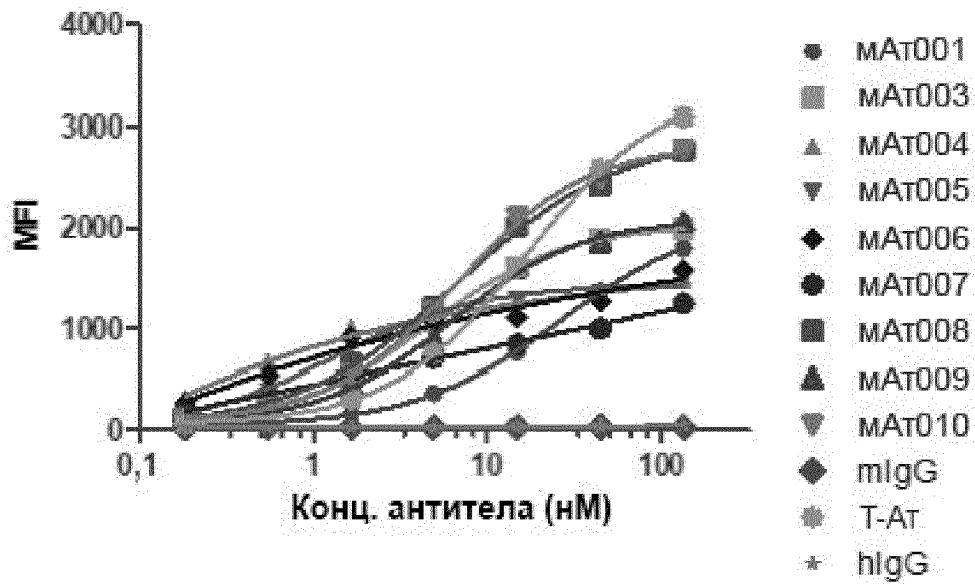
Фиг. 6D



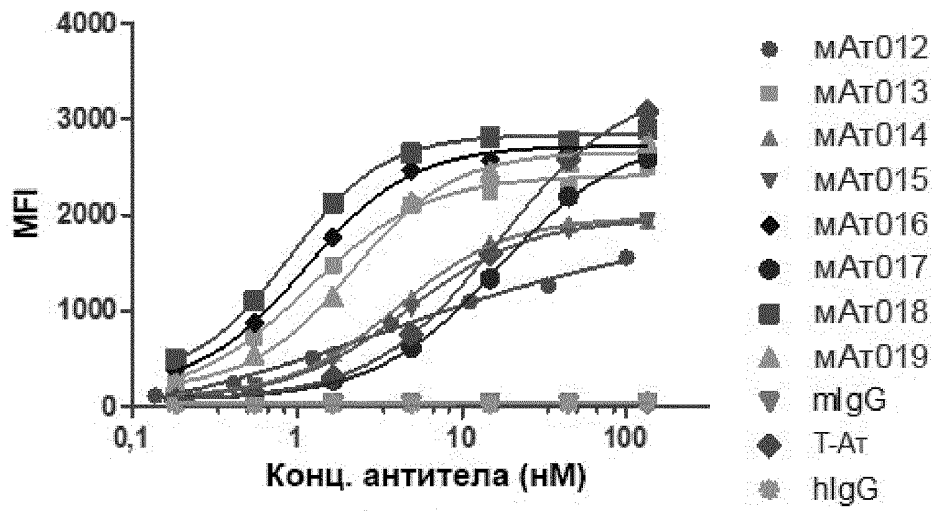
Фиг. 6E



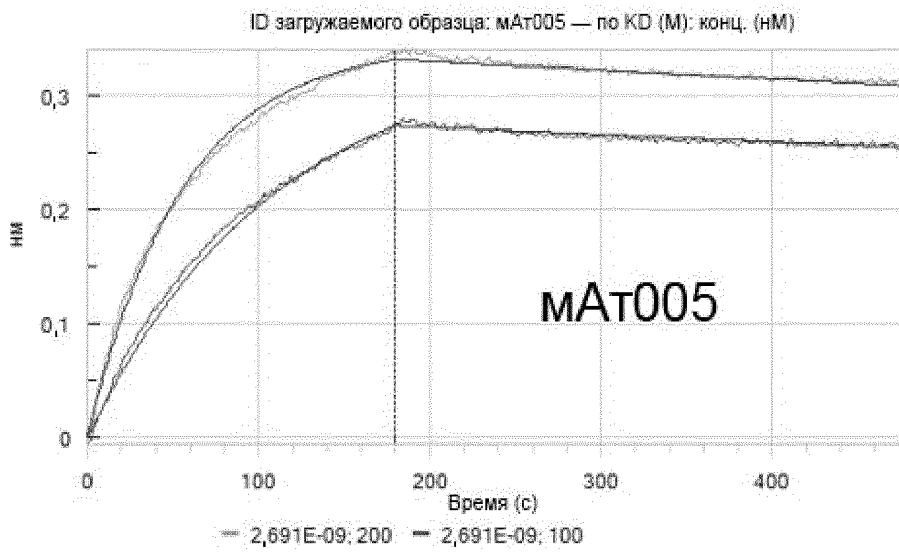
Фиг. 6F



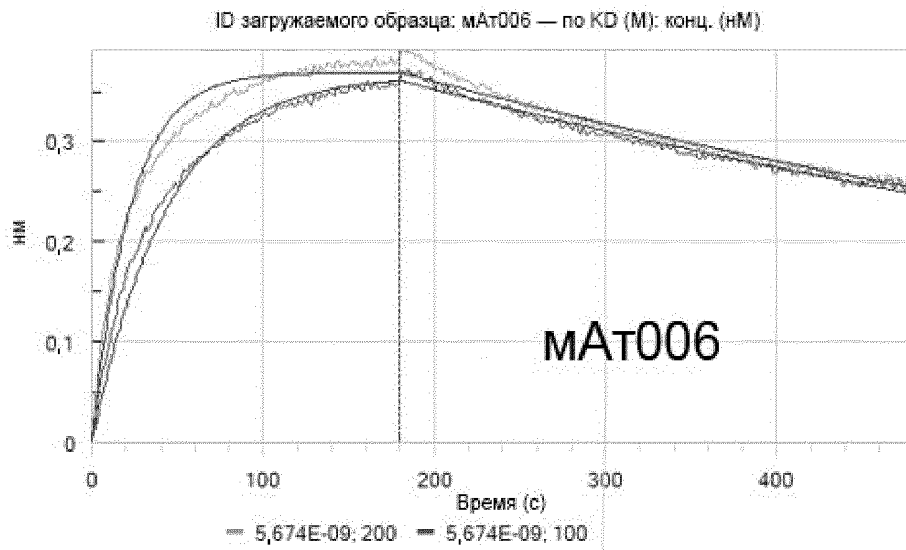
Фиг. 6G



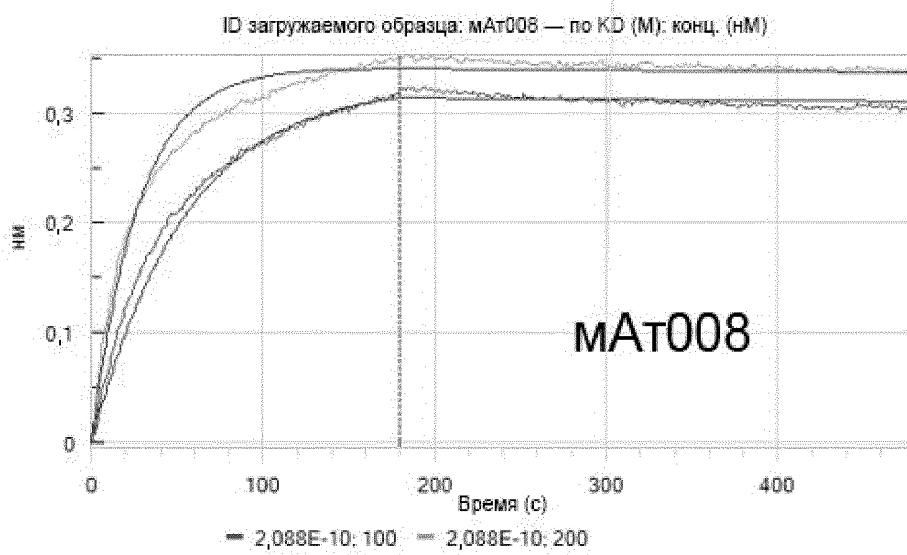
Фиг. 6Н



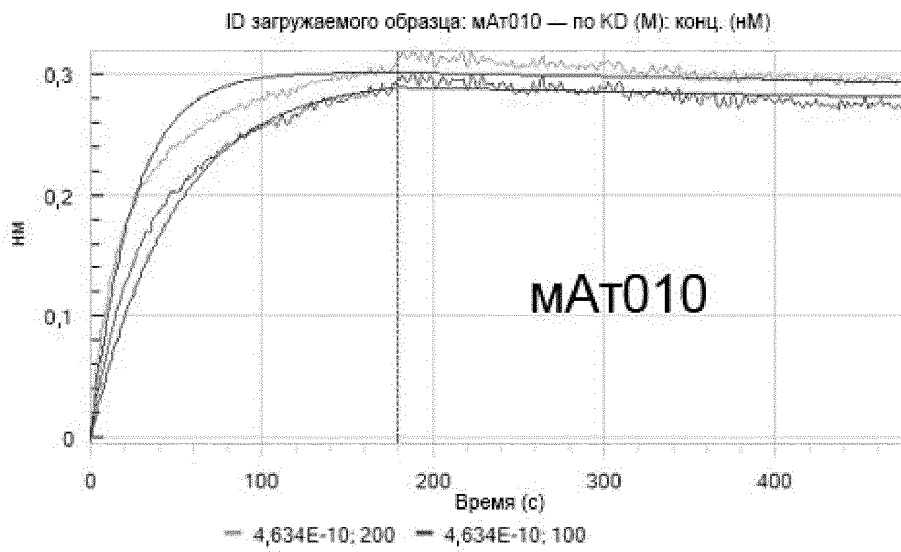
Фиг. 7А



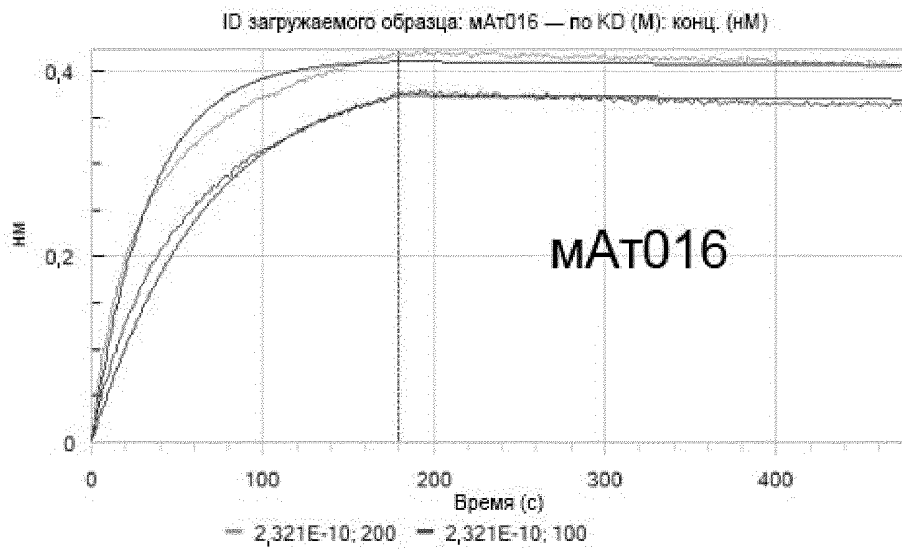
Фиг. 7В



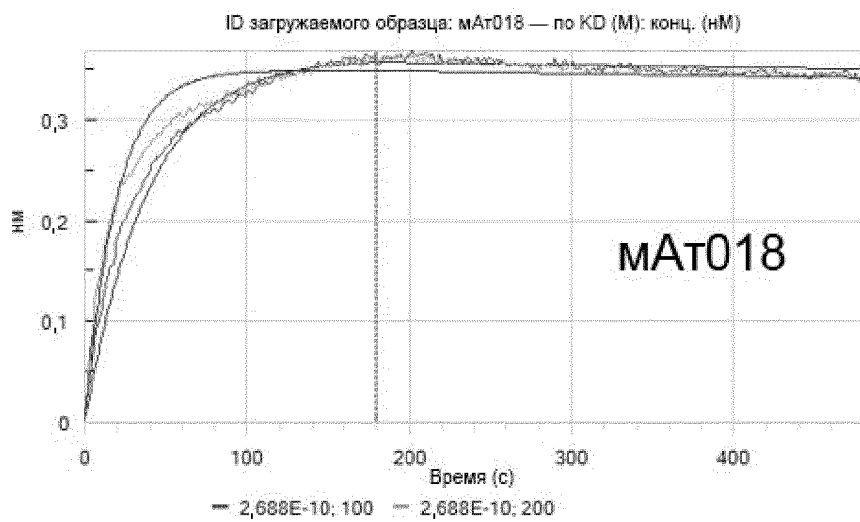
Фиг. 7С



Фиг. 7D



Фиг. 7E



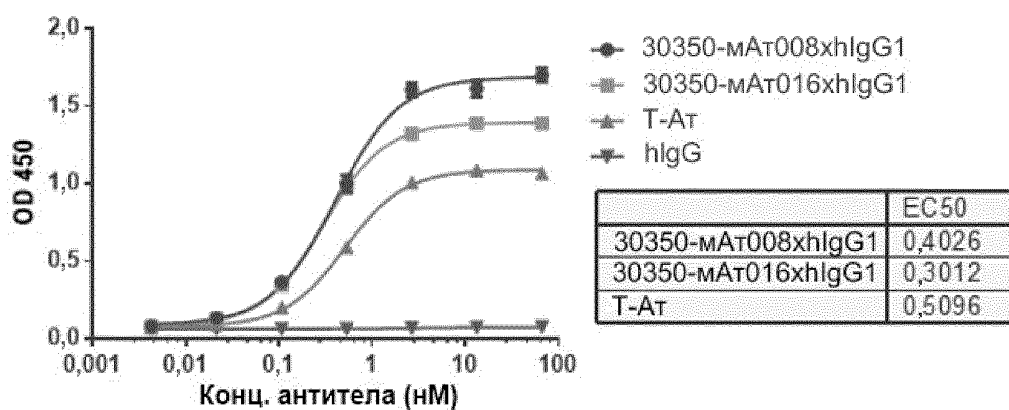
Фиг. 7F

Антиген	Антитело	Полный R ²	kon (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
5T4-Fc	МАТ005	0,9966	8,93E+04	2,40E-04	2,691E-09
	МАТ006	0,9782	2,20E+05	1,25E-03	5,674E-09
	МАТ008	0,9804	1,85E+05	3,87E-05	2,088E-10
	МАТ010	0,9629	2,06E+05	9,53E-05	4,634E-10
	МАТ016	0,9841	1,50E+05	3,48E-05	2,321E-10
	МАТ018	0,9607	2,59E+05	6,97E-05	2,688E-10

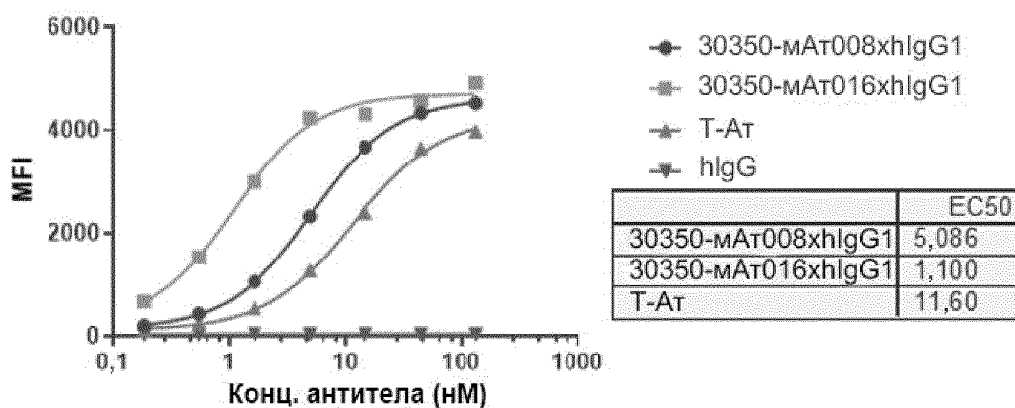
Фиг. 7G

Захватывающие или Конкурентные ат	МАт001	МАт003	МАт009	МАт014	МАт015	МАт008	МАт010	МАт017	МАт005	МАт006	МАт004	МАт016	МАт018	МАт019	МАт013
МАт001	95%	93%	93%	90%	91%	93%	93%	93%	-18%	-20%	-25%	11%	0%	-1%	18%
МАт003	96%	94%	95%	94%	94%	96%	96%	94%	-35%	-15%	-14%	7%	5%	2%	12%
МАт009	96%	95%	95%	94%	95%	96%	95%	95%	-42%	-26%	-28%	11%	4%	7%	13%
МАт014	96%	95%	96%	94%	94%	95%	96%	94%	-32%	-20%	-29%	16%	11%	4%	29%
МАт015	96%	96%	96%	95%	95%	96%	96%	97%	-46%	-8%	-21%	31%	9%	0%	20%
МАт008	96%	95%	95%	94%	95%	95%	95%	96%	38%	38%	3%	21%	11%	5%	30%
МАт010	96%	95%	95%	95%	94%	96%	95%	96%	30%	34%	2%	15%	6%	5%	21%
МАт017	96%	95%	95%	93%	94%	96%	95%	95%	26%	42%	0%	11%	11%	8%	-2%
МАт005	22%	6%	5%	3%	2%	15%	8%	7%	87%	92%	87%	52%	51%	68%	41%
МАт006	49%	13%	14%	0%	6%	40%	15%	19%	76%	89%	83%	57%	61%	69%	33%
МАт004	51%	12%	16%	-2%	5%	43%	15%	16%	81%	92%	87%	62%	66%	73%	39%
МАт016	60%	22%	27%	11%	14%	43%	26%	28%	91%	95%	95%	95%	94%	94%	96%
МАт018	62%	22%	28%	10%	14%	51%	29%	29%	93%	95%	96%	96%	96%	96%	97%
МАт019	52%	24%	23%	8%	14%	44%	26%	27%	93%	95%	96%	94%	94%	96%	95%
МАт013	44%	14%	12%	3%	4%	27%	18%	13%	89%	93%	91%	88%	83%	87%	88%

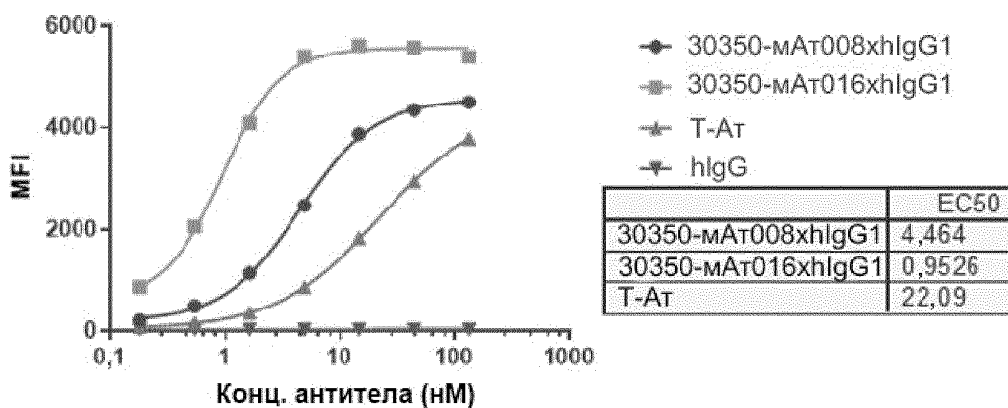
Фиг. 8



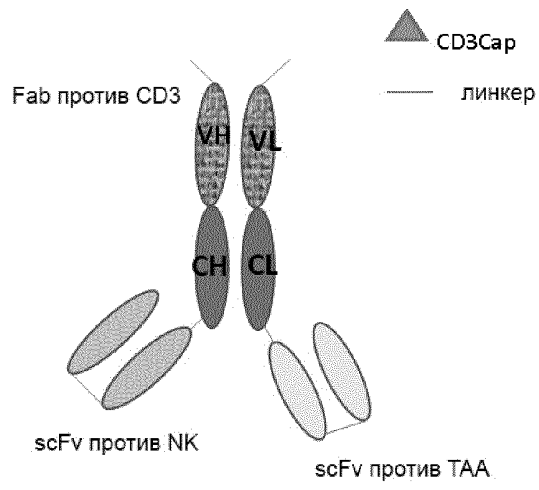
Фиг. 9А



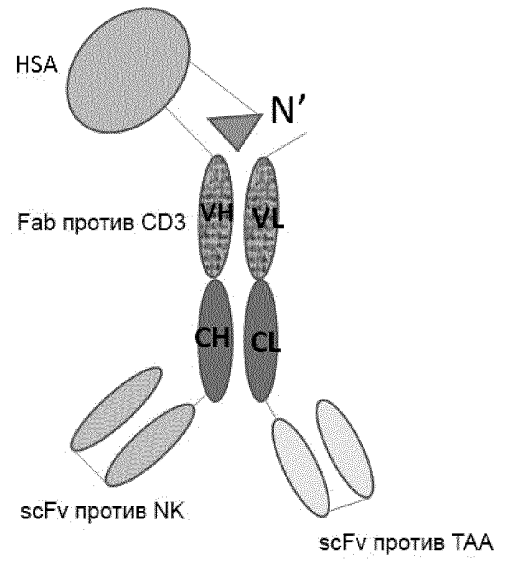
Фиг. 9В



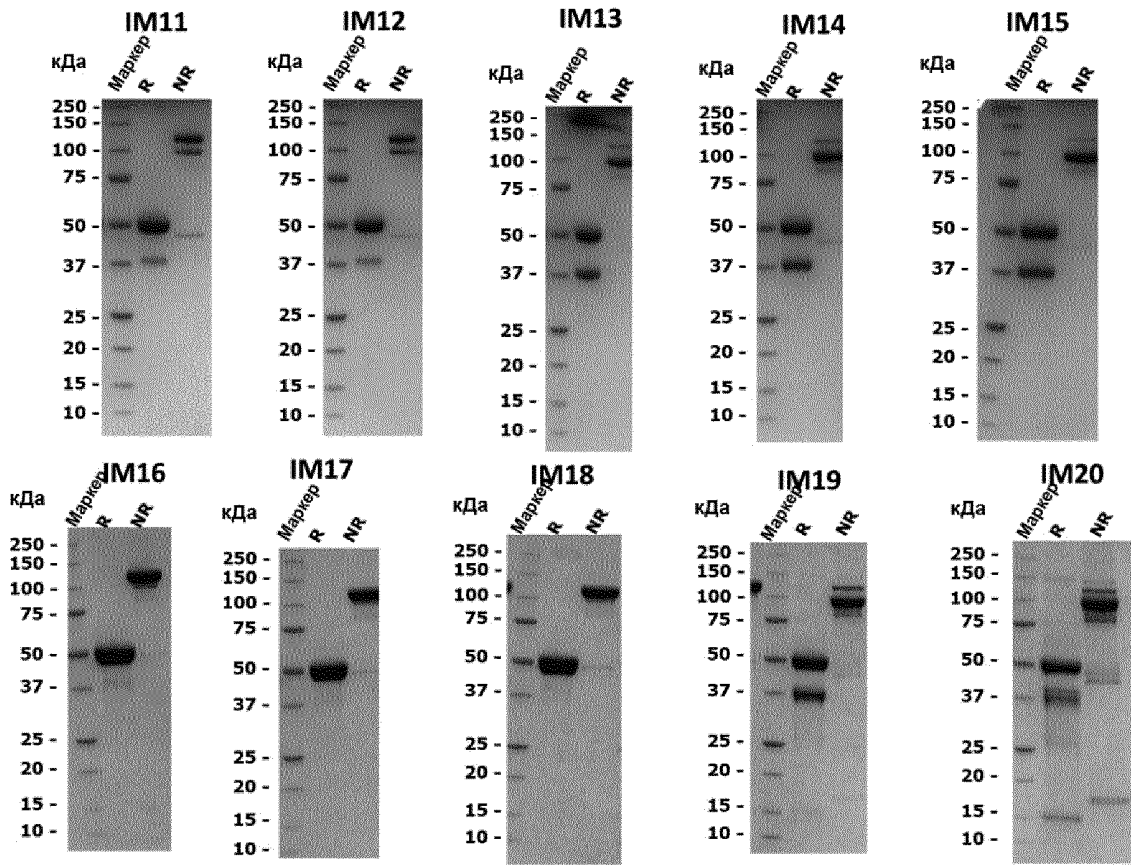
Фиг. 9С



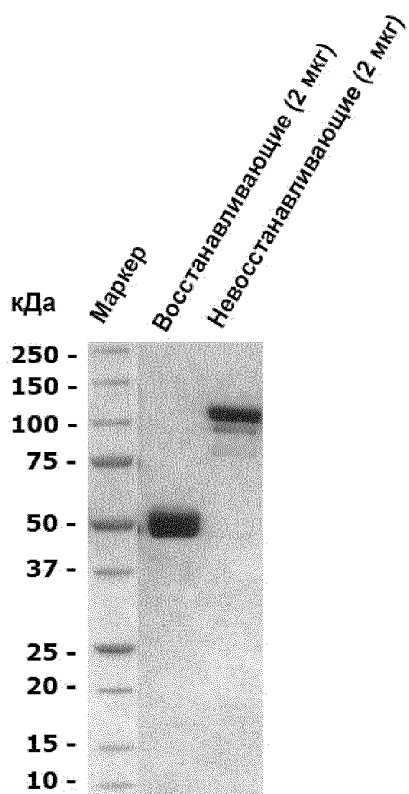
Фиг. 10А



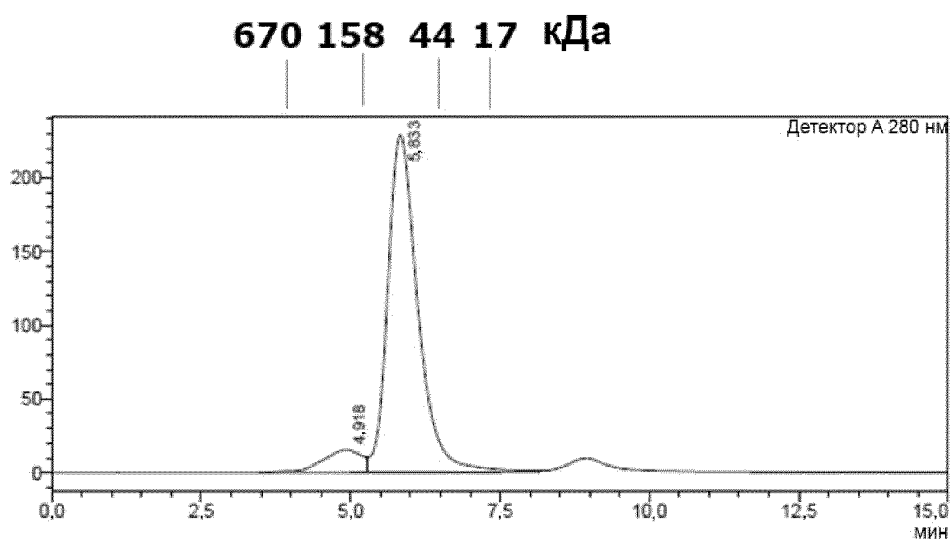
Фиг. 10В



Фиг. 11



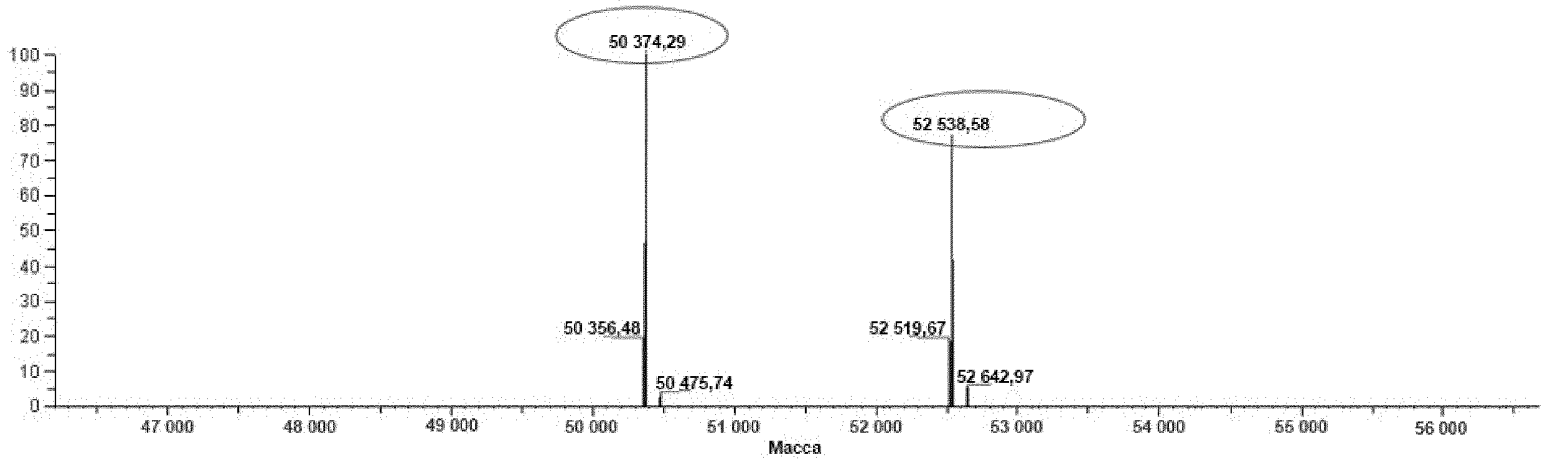
Фиг. 12А



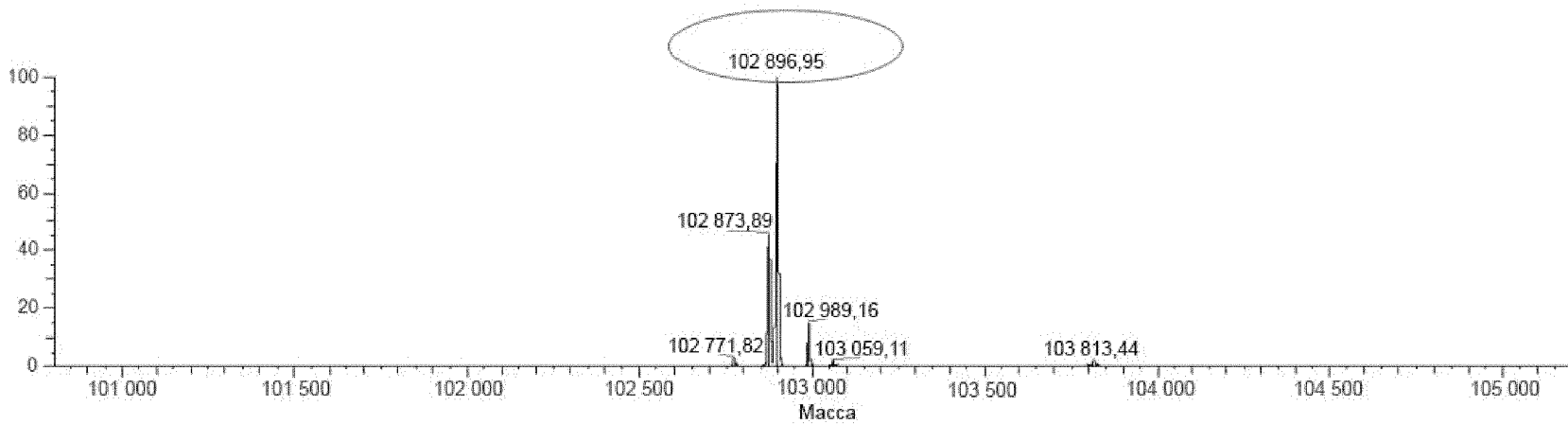
<Таблица пиков>

Детектор А 280 нм				
Время удерж.	Площадь	Площадь, %	Высота	Высота, %
4,918	707 454	8,048	15 376	6,294
5,833	8 083 379	91,952	228 917	93,706
	8 790 833	100,000	244 293	100,000

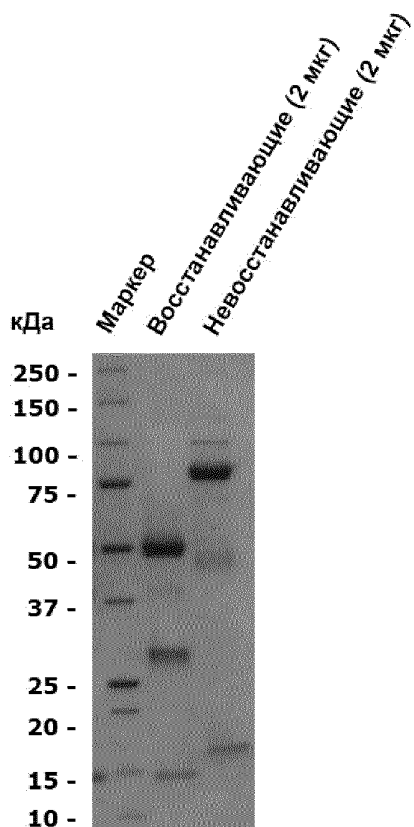
Фиг. 12В



Фиг. 13А

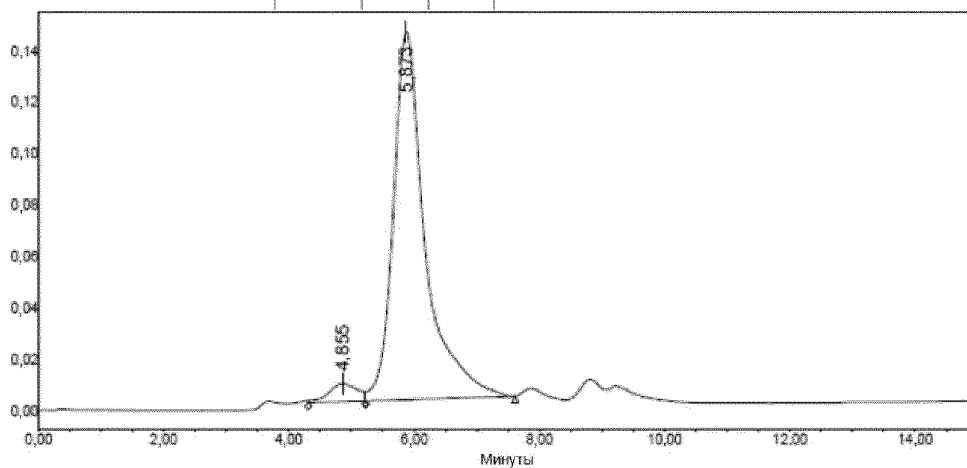


Фиг. 13В



Фиг. 14А

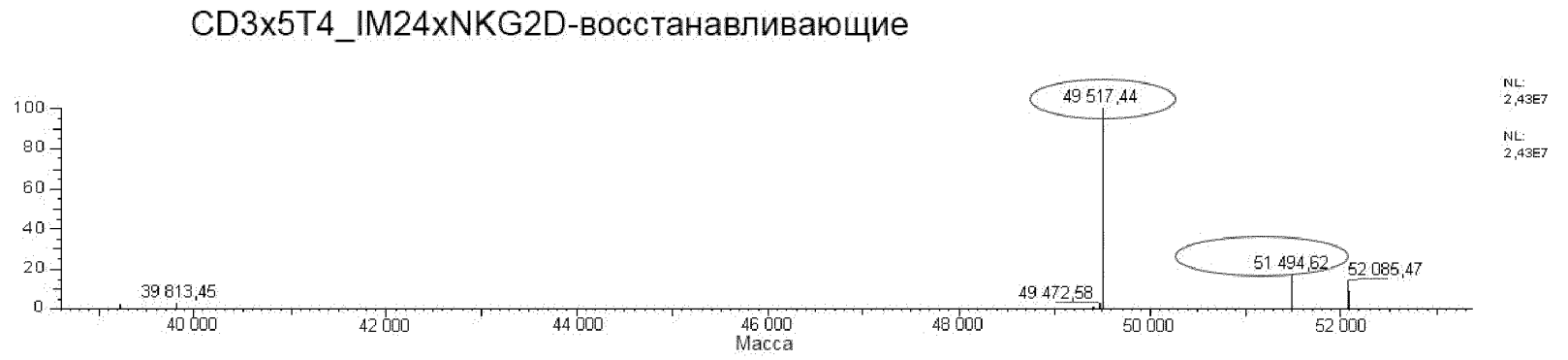
670 158 44 17 кДа



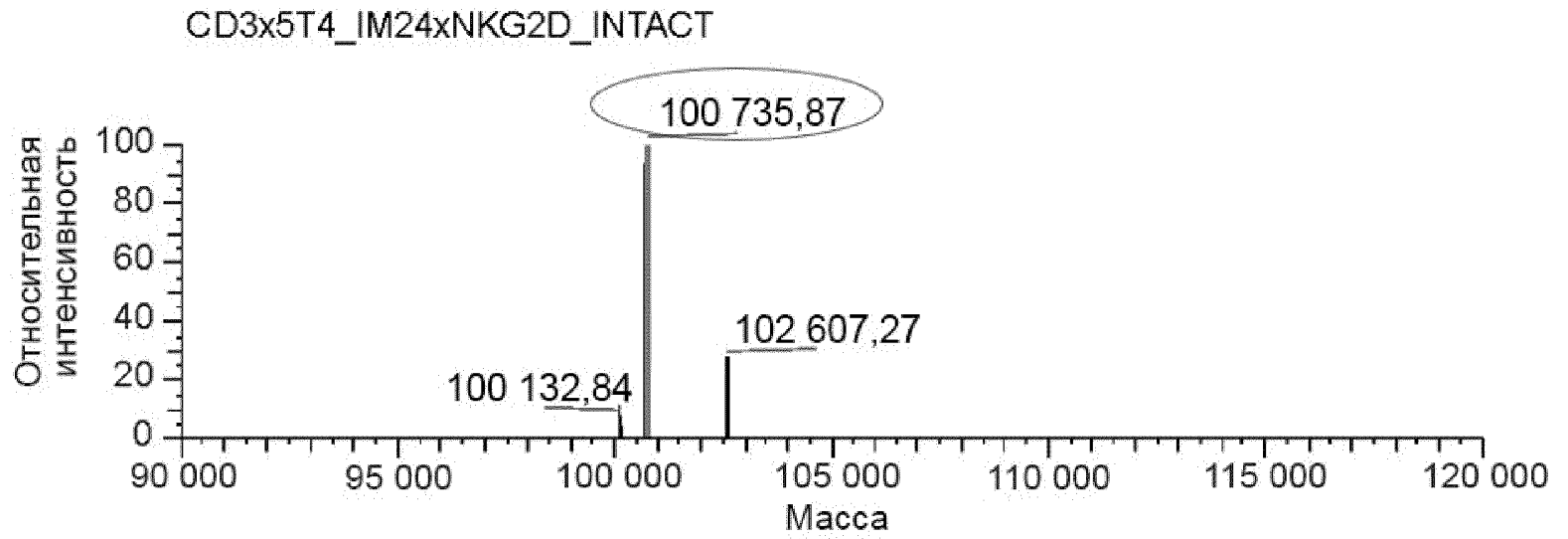
— Название образца: CD35T4IM21NKG2D; дата регистрации: 23/9/2020 14:24:55; флакон: 81; инъекция: 1

	Время удерж. (мин)	Площадь	% площади	Высота	% высоты
1	4,855	225 051,299	4,26	7020	4,68
2	5,873	5 055 350,911	95,74	143 066	95,32

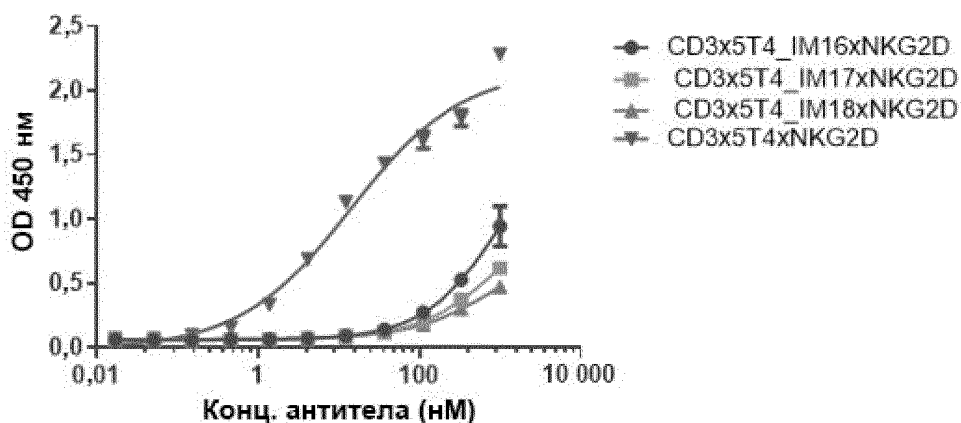
Фиг. 14В



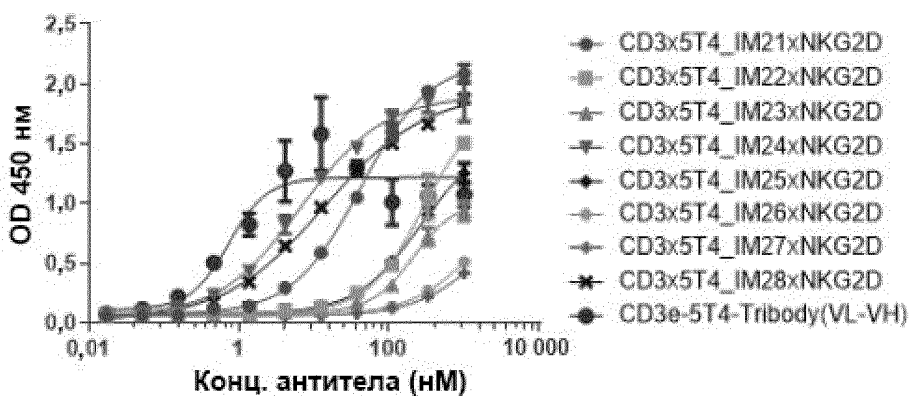
Фиг. 15А



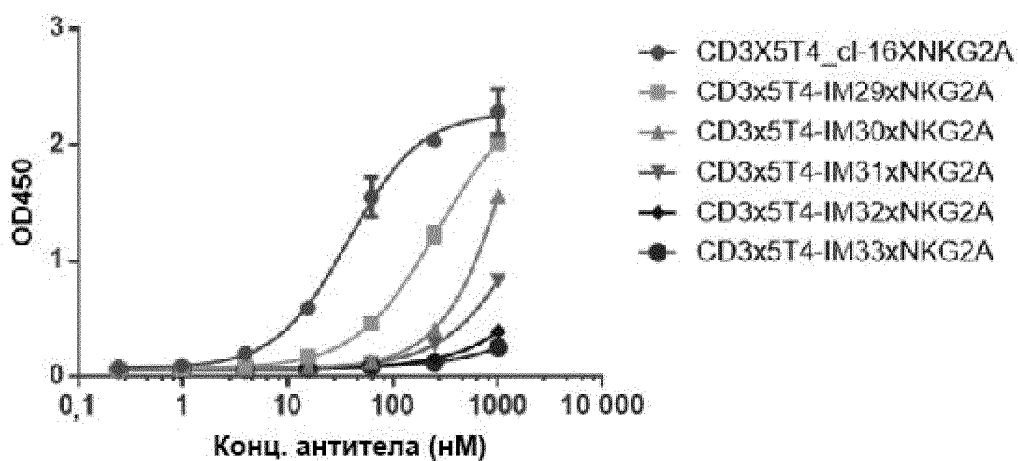
Фиг. 15В



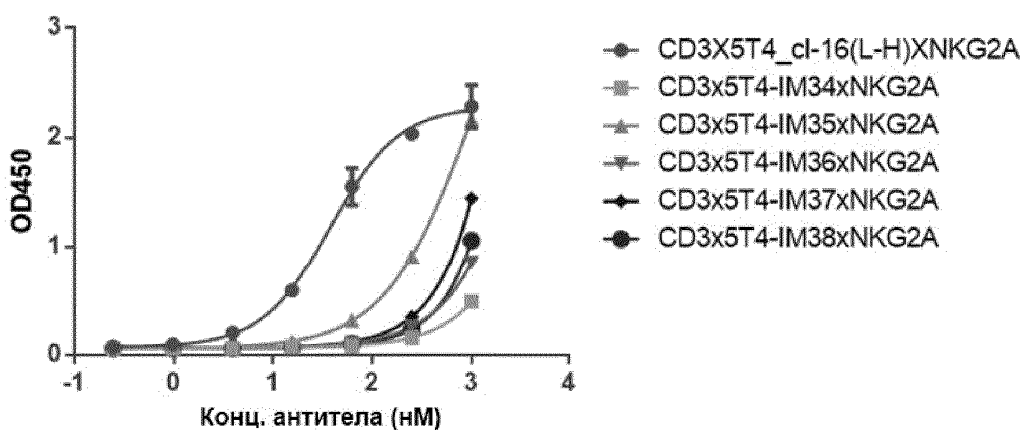
Фиг. 16А



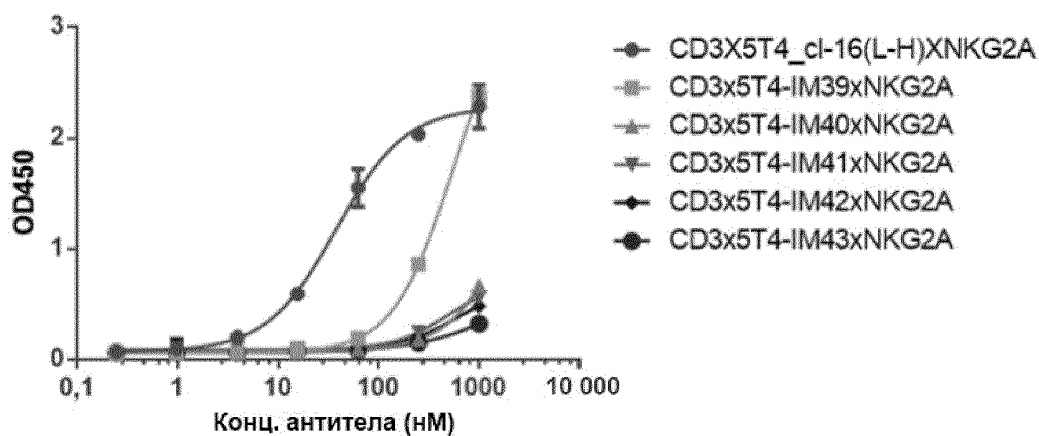
Фиг. 16В



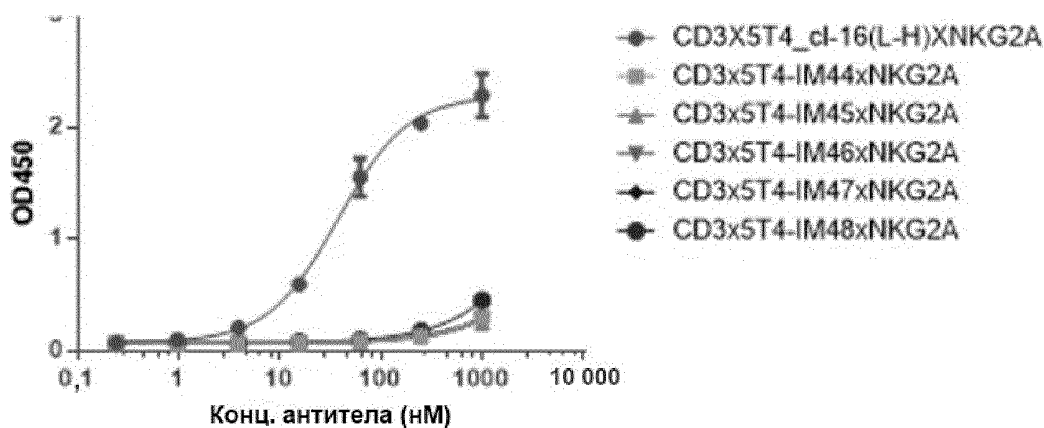
Фиг. 16С



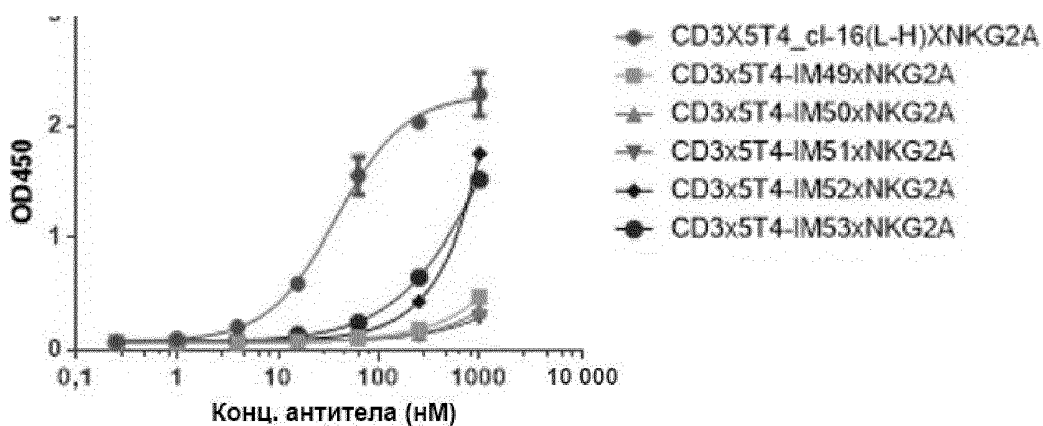
Фиг. 16D



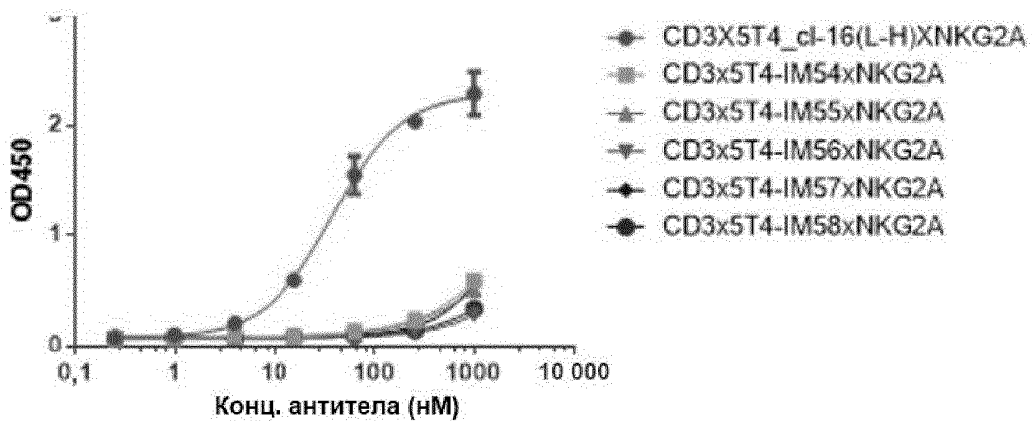
Фиг. 16E



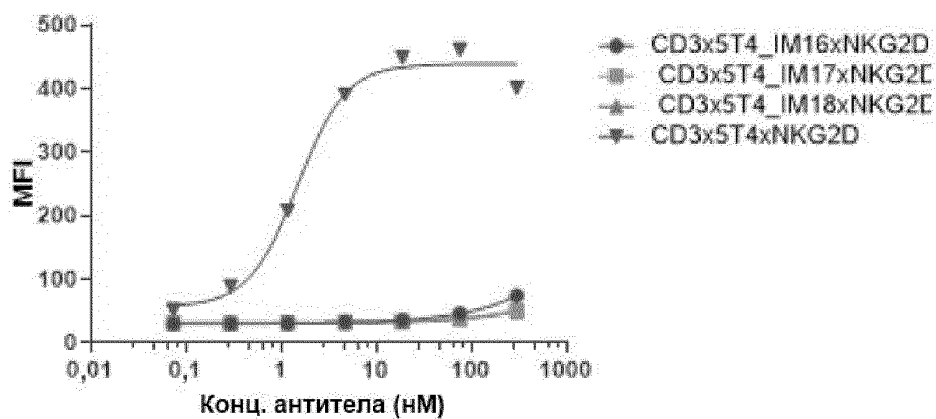
Фиг. 16F



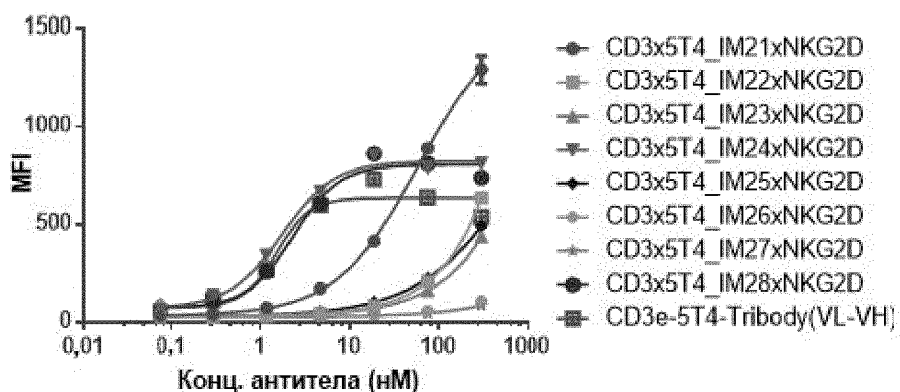
Фиг. 16G



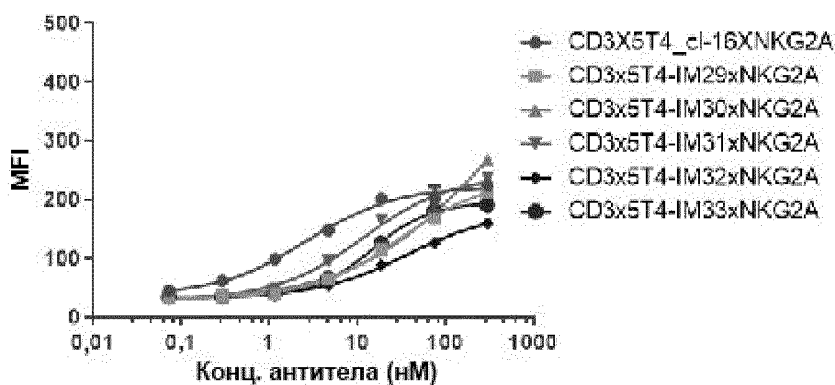
Фиг. 16H



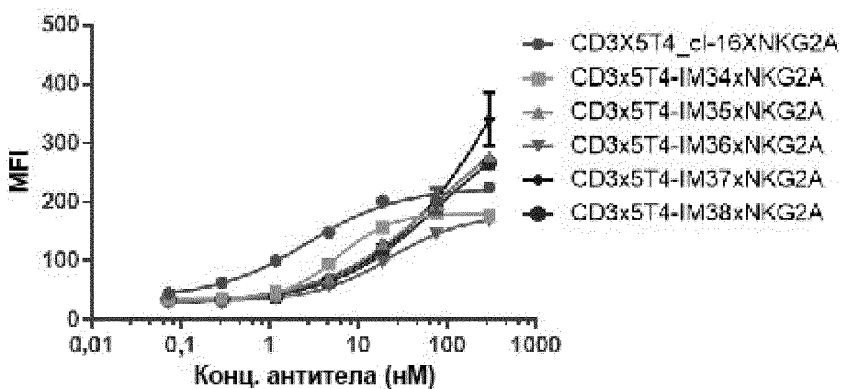
Фиг. 17A



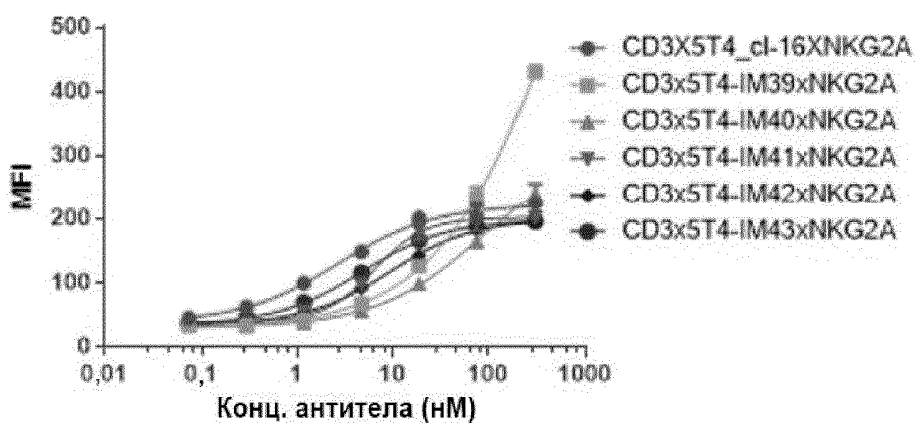
Фиг. 17B



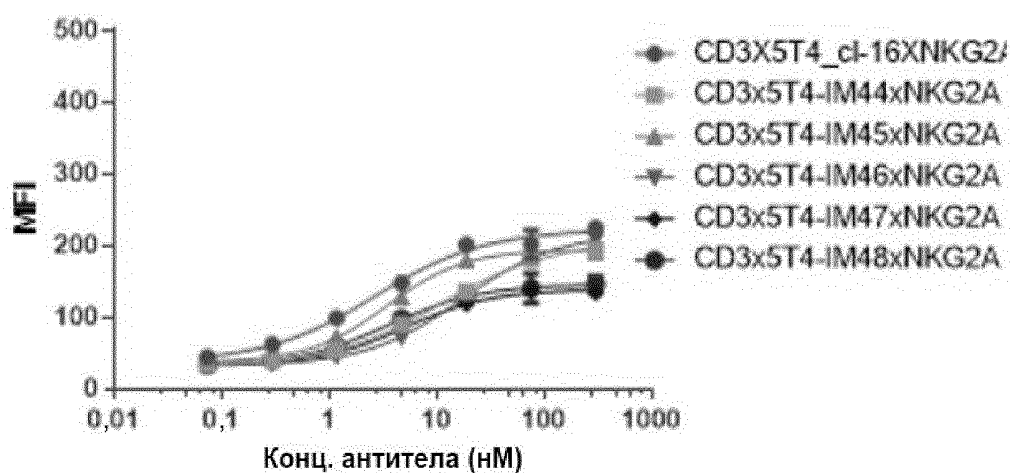
Фиг. 17C



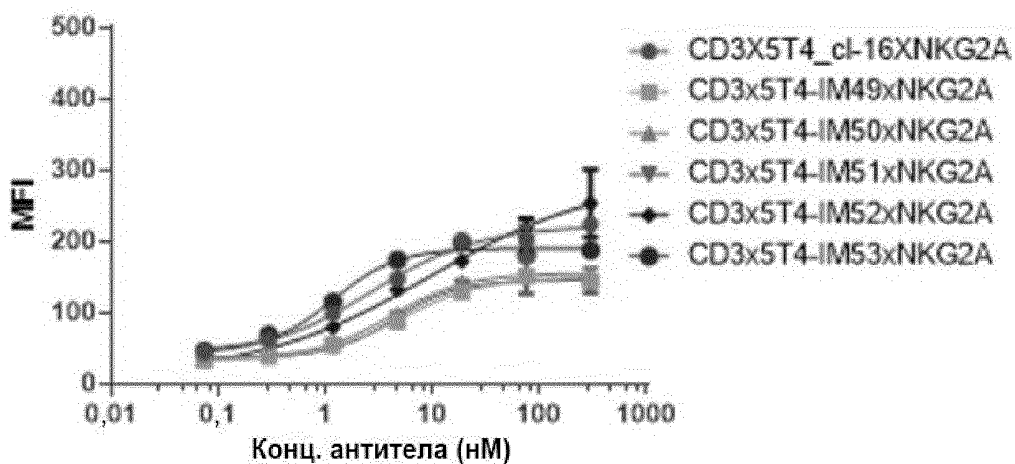
Фиг. 17D



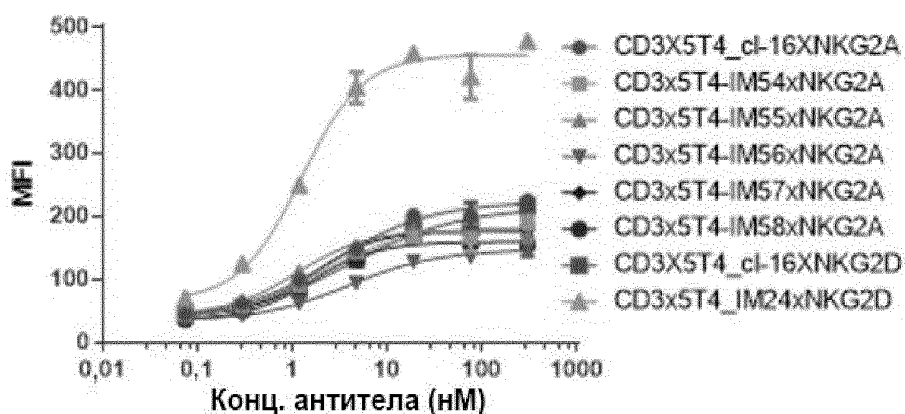
Фиг. 17E



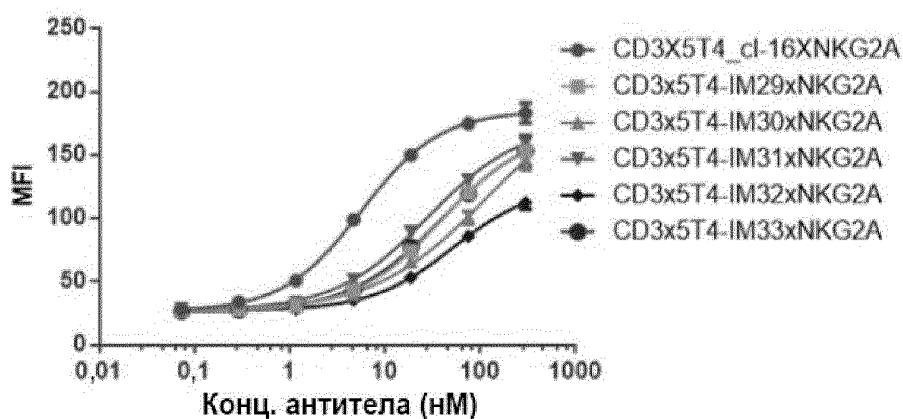
Фиг. 17F



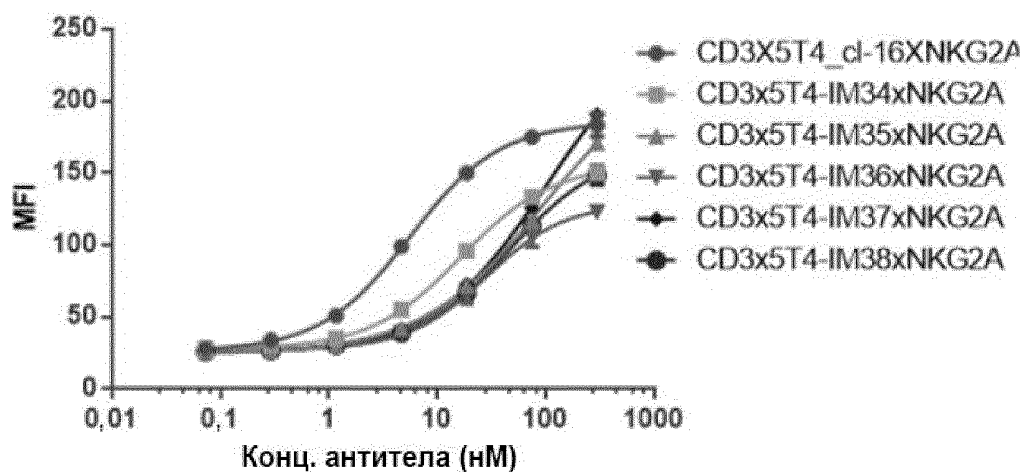
Фиг. 17G



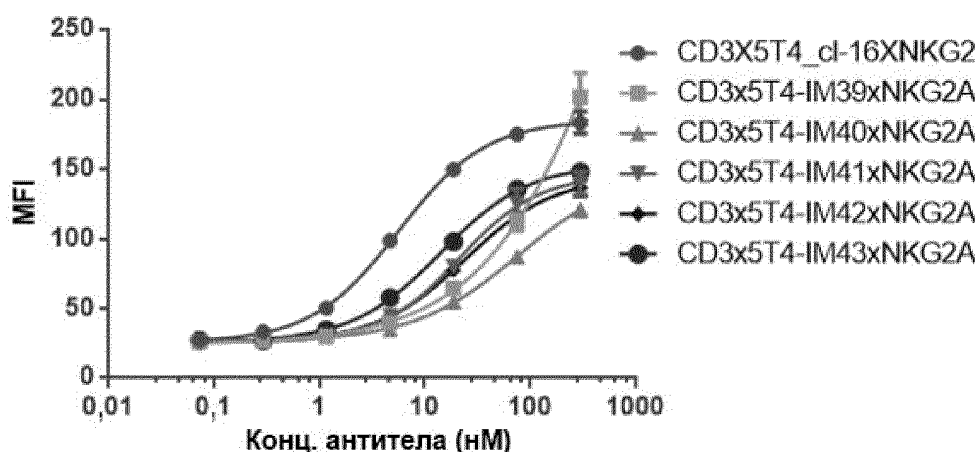
Фиг. 17H



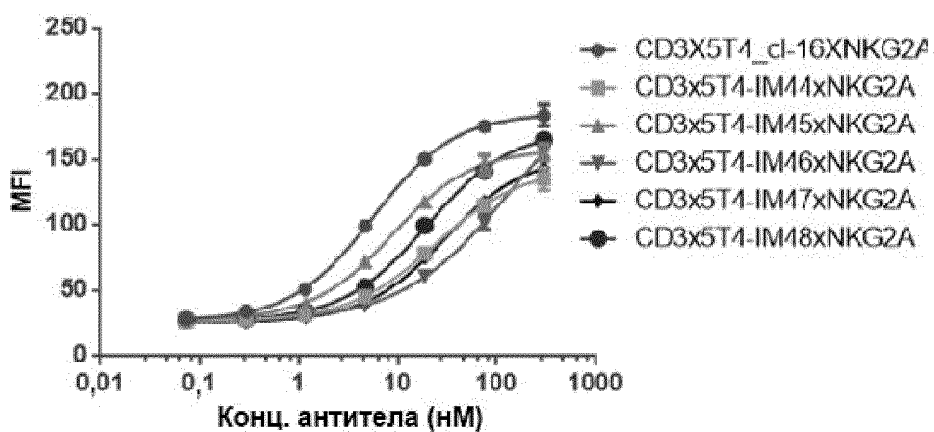
Фиг. 17I



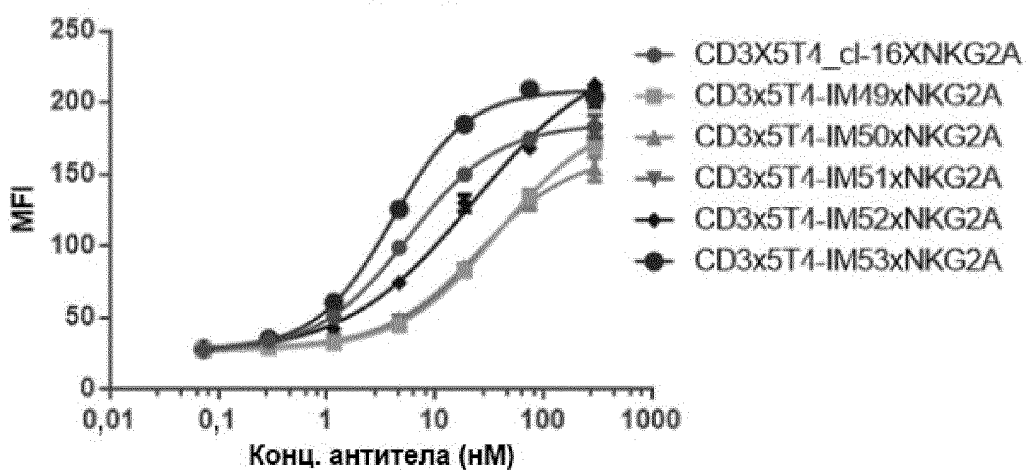
Фиг. 17J



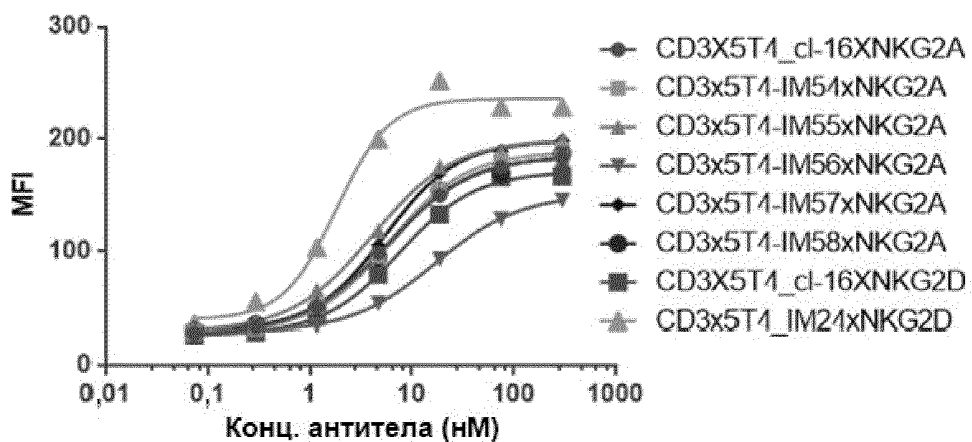
Фиг. 17К



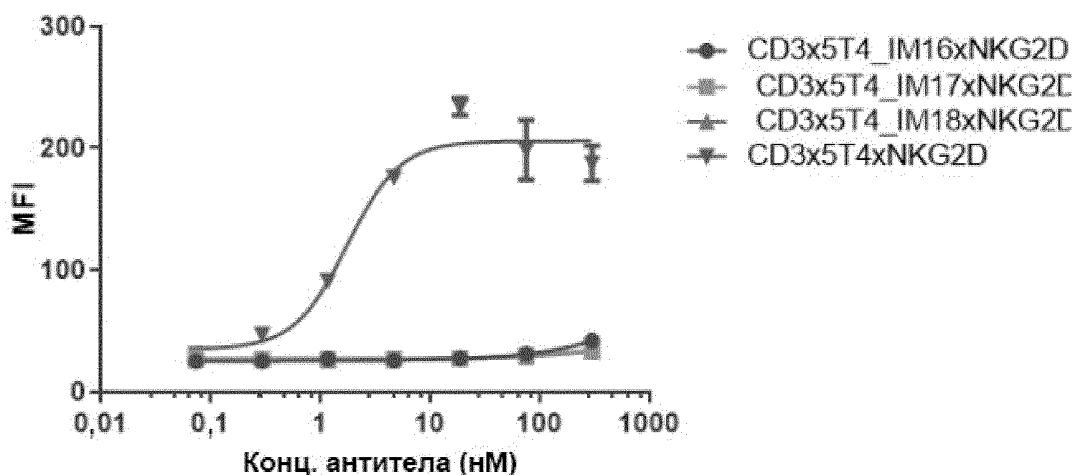
Фиг. 17L



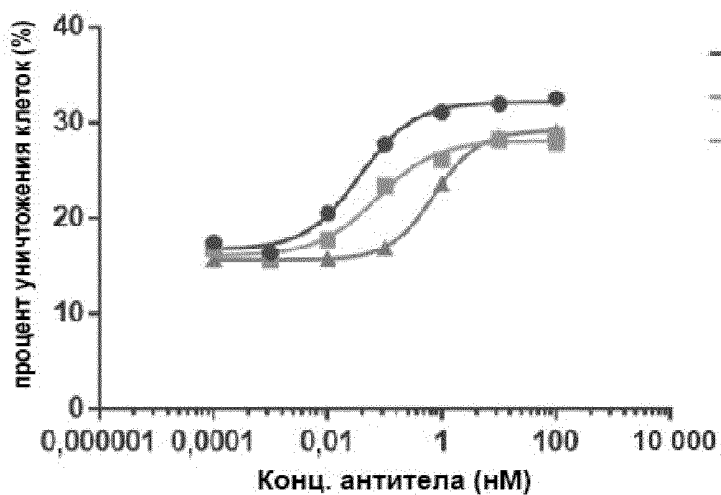
Фиг. 17М



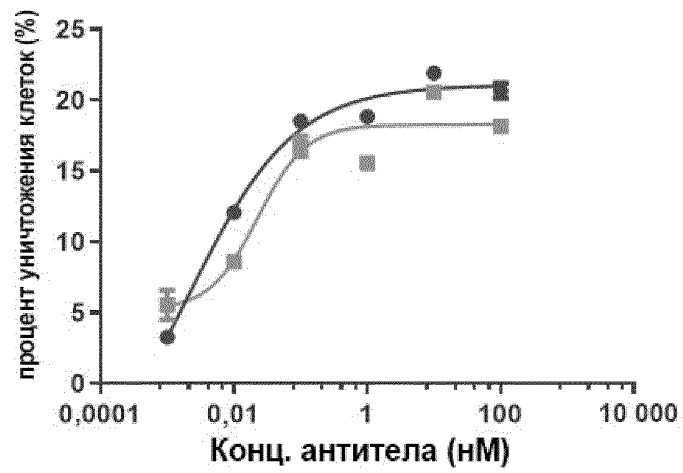
Фиг. 17N



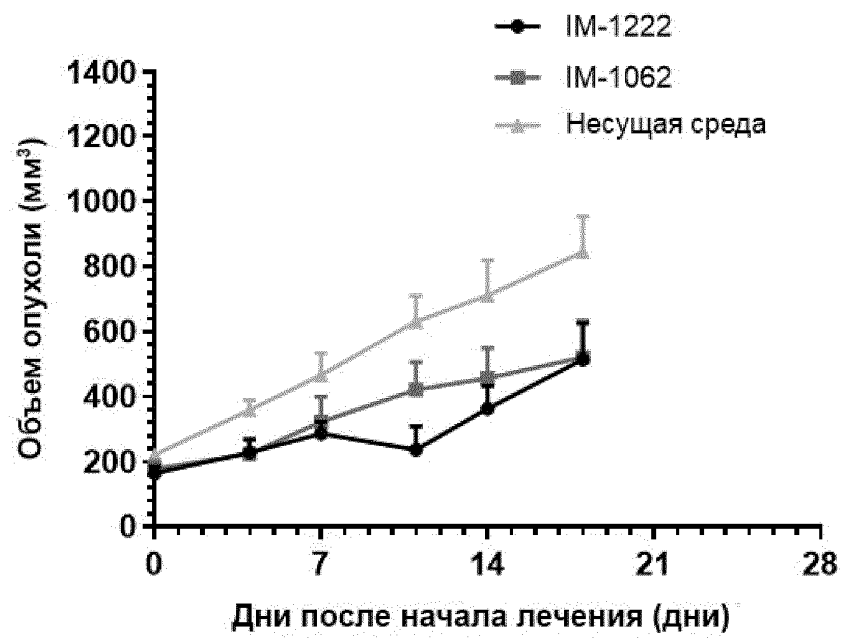
Фиг. 17O



Фиг. 18A



Фиг. 18В



Фиг. 19