

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046268**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.21

(21) Номер заявки
202192736

(22) Дата подачи заявки
2020.04.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ТОЛЬКО ТЯЖЕЛЫЕ ЦЕПИ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ПСМА

(31) 62/830,130

(32) 2019.04.05

(33) US

(43) 2022.01.27

(86) PCT/US2020/026686

(87) WO 2020/206330 2020.10.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕНЕОБИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ван Схотен Вим, Кларк Старлин,
Дэнг Кевин, Бьюлоу Бен (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2017122019
WO-A1-2016187594

MAHMOUD HASSANI ET AL.:
"Construction of a chimeric antigen receptor bearing a nanobody against prostate a specific membrane antigen in prostate cancer", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 120, no. 6, 22 January 2019 (2019-01-22), pages 10787-10795, XP055696932, ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.28370, the whole document, paragraph [03.6]

WO-A1-2019012260
HAMED ZARE ET AL.: "Production of nanobodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA) recognizing LnCaP cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MARKERS, vol. 29, no. 2, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 169-179, XP055353599, IT, ISSN: 0393-6155, DOI: 10.5301/jbm.5000063, the whole document

(57) В изобретении раскрыты антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА (UniAb™), а также способы получения таких антител, композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применение для лечения расстройств, характеризующихся экспрессией ПСМА.

B1

046268

046268

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/830130, поданной 05 апреля 2019 г., описание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 09 июля 2020 г., называется TNO-0016-WO_SL.txt и имеет размер 121310 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам, содержащим только тяжелые цепи, (например, UniAb™) которые связываются с ПСМА (англ.: PSMA -prostate specific membrane antigen). Данное изобретение также относится к способам получения таких антител, к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применению для лечения расстройств, которые характеризуются экспрессией ПСМА.

Уровень техники

ПСМА.

ПСМА, также известный как простатспецифический мембранный антиген и глутаматкарбоксипептидаза II (UniProt Q04609), представляет собой трансмембранный белок типа II, который обладает активностью N-ацетилированной альфа-связанной кислотой дипептидазы, фолатгидролазы и дипептидилпептидазы. Он кодируется геном FOLH1 у человека и состоит из цитоплазматического домена из 19 аминокислот, трансмембранной части из 24 аминокислот и внеклеточной части из 707 аминокислот. Белок является ферментативно активным в качестве нековалентного гомодимера. ПСМА экспрессируется в ткани эпителия предстательной железы и его экспрессия усиливается в злокачественном новообразовании предстательной железы и в новой сосудистой сети солидных опухолей. Он также экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях, таких как мозг, почки и слюнные железы, но его избыточная экспрессия в злокачественной ткани предстательной железы делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения злокачественного новообразования предстательной железы. Он также может быть актуален для терапии или визуализации солидных опухолей, учитывая его высокую экспрессию в злокачественных новообразованных сосудах. Моноклональные антитела, конъюгаты антител-лекарственное средство и Т-клетки с химерным антигенным рецептором, нацеленные на ПСМА, были описаны в контексте лечения метастатического злокачественного новообразования предстательной железы (Hernandez-Hoyos et al 2016, PMID: 27406985, DiPippo et al 2014, PMID: 25327986, Serganova et al 2016, PMID: 28345023). Кроме того, радионуклидные конъюгаты, специфичные для ПСМА, исследуют в отношении визуализации и лечения злокачественного новообразования предстательной железы (например, Hofman et al., 2018 PMID: 29752180).

Антитела, содержащие только тяжелые цепи.

В обычном антителе IgG, ассоциация тяжелой цепи и легкой цепи частично обусловлена гидрофобным взаимодействием между константной областью легкой цепи и константным доменом CH1 тяжелой цепи. В областях тяжелой цепи каркаса 2 (FR2) и каркаса 4 (FR4) имеются дополнительные остатки, которые также способствуют этому гидрофобному взаимодействию между тяжелой и легкой цепями.

Известно, однако, что сыворотка верблюдовых (подгруппа Tylopoda, которая включает верблюдов, дромадеров и лам) содержит основной тип антител, состоящих исключительно из парных H-цепей (антитела, содержащие только тяжелые цепи, или UniAb™). UniAb™ Camelidae (Camelus dromedarius, Camelus bactrianus, Lama glama, Lama guanaco, Lama alpaca и Lama vicugna) имеют уникальную структуру, состоящую из одного варибельного домена (VHH), шарнирной области и двух константных доменов (CH2 и CH3), которые высокогомологичны доменам CH2 и CH3 классических антител. Данные UniAb™ не имеют первого домена константной области (CH1), который присутствует в геноме, но удаляется во время процессинга мРНК. Отсутствие домена CH1 объясняет отсутствие легкой цепи в UniAb™, поскольку этот домен является местом присоединения константного домена легкой цепи. Такие UniAb™ естественным образом эволюционировали для придания антигенсвязывающей специфичности и высокой аффинности тремя CDR из обычных антител, или их фрагментов (Muyltermans, 2001; J Biotechnol 74:277-302; Revets et al., 2005; Expert Opin Biol Ther 5:111-124). Хрящевые рыбы, такие как акулы, также выработали особый тип иммуноглобулина, обозначенный как IgNAR, который лишен легких полипептидных цепей и полностью состоит из тяжелых цепей. Молекулами IgNAR можно манипулировать с помощью молекулярной инженерии для получения варибельного домена полипептида с одной тяжелой цепью (vNAR) (Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004); Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)).

Способность антител, содержащих только тяжелые цепи, лишенных легкой цепи, связывать антиген была установлена в 1960-х годах (Jaton et al. (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195). Тяжелая цепь иммуноглобулина, физически отделенная от легкой цепи, сохранила 80% антигенсвязывающей активности отно-

сительно тетрамерного антитела. Sitia et al. (1990) Cell, 60, 781-790 продемонстрировали, что удаление домена CH1 из перегруппированного гена μ мыши приводит к получению антитела, содержащего только тяжелые цепи, лишённого легкой цепи, в клеточной культуре млекопитающих. Вырабатываемые антитела сохраняли специфичность связывания VH и эффекторные функции.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, с высокой специфичностью и аффинностью могут создаваться против различных антигенов посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999)), а часть VHH может быть легко клонирована и экспрессирована в дрожжах (Frenken, L.G.J., et al. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. et al. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997)).

Мыши, у которых λ (лямбда) локус легкой (L)-цепи и/или λ и κ (каппа) локусы L-цепи были функционально подвергнуты сайленсингу, и антитела, продуцируемые такими мышами, описаны в патентах США № 7541513 и 8367888. Рекомбинантное продуцирование антител, содержащих только тяжелую цепь, у мышей и крыс было описано, например, в WO2006008548; публикации заявки на патент США № 20100122358; Nguyen et al., 2003, Immunology; 109(1), 93-101; Brüggemann et al., Crit. Rev. Immunol; 2006, 26(5):377-90; и Zou et al., 2007, J Exp Med; 204(13): 3271-3283. Получение нокаутных крыс с помощью микроинъекций эмбрионам цинк-пальцевой нуклеазы описано в Geurts et al., 2009, Science, 325(5939):433. Растворимые антитела, содержащие только тяжелые цепи, и трансгенные грызуны, содержащие гетерологичный локус тяжелой цепи, продуцирующий такие антитела, описаны в патентах США № 8883150 и 9365655. Структуры CAR-T, содержащие однодоменные антитела в качестве связывающего (нацеливающего) домена, описаны, например, в Iri-Sofla et al., 2011, Experimental Cell Research 317:2630-2641 и Jamnani et al., 2014, Biochim Biophys Acta, 1840:378-386.

Сущность изобретения

Аспекты изобретения относятся к антителам, содержащим только тяжелые цепи, включая, но не ограничиваясь, UniAb™, с аффинностью связывания с ПСМА. Дальнейшие аспекты изобретения относятся к способам получения таких антител, композициям, содержащим такие антитела, и их применению для лечения расстройств, которые характеризуются экспрессией ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с ПСМА, содержит первую варируемую область тяжелой цепи, содержащую: (a) CDR1, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10; и/или (b) CDR2, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-17; и/или (c) CDR3, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18-23. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит вторую варируемую область тяжелой цепи, содержащую: (a) CDR1, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10; и/или (b) CDR2, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-17; и/или (c) CDR3, имеющую две или менее замен в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18-23. В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в человеческом каркасе. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

В некоторых вариантах осуществления первая варируемая область тяжелой цепи антитела содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10; и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17; и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит вторую варируемую область тяжелой цепи, которая содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10; и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17; и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10; и (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17; и (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вторую варируемую область тяжелой цепи, которая содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10; и (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17; и (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18; или (b) последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность варируемой области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последова-

тельности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 24-58. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24-58. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с ПСМА, содержит первую вариательную область тяжелой цепи, содержащую: (а) последовательность CDR1 формулы:

G G S I S S X₁ X₂ Y X₃ (SEQ ID NO: 67),

где X представляет собой S или N; X₂ представляет собой S или N; и X₃ представляет собой Y или F; и (b) последовательность CDR2 формулы:

X₄ X₅ X₆ S G X₇ T (SEQ ID NO: 68),

где X₄ представляет собой I или V; X₅ представляет собой D или Y; X₆ представляет собой Y или D; и X₇ представляет собой Y или S; и (c) представляет собой CDR3 формулы:

ARNKAATADFDY (SEQ ID NO: 69), в одновалентном или двухвалентном формате.

В некоторых вариантах осуществления антитела, которое связывается с ПСМА, содержит первую вариательную область тяжелой цепи, содержащую: (а) последовательность CDR1 формулы:

G F X₁ F X₂ X₃ Y G (SEQ ID NO: 70),

где X₁ представляет собой S или I, или T; X₂ представляет собой S или T, или R, или I; и X₃ представляет собой R или S; и (b) последовательность CDR2 формулы:

I X₄ Y D G S N X₅ (SEQ ID NO: 71),

где X₄ представляет собой W или S; и X₅ представляет собой R или K; и (c) последовательность CDR3 формулы:

AREPRX₆GYYYX₇X₈SGYX₉SLDY (SEQ ID NO: 72),

где X₆ представляет собой I или V; X₇ представляет собой E или D; X₈ представляет собой S или T; и X₉ представляет собой Y или D, в одновалентном или двухвалентном формате.

В некоторых вариантах осуществления антитела, связывающее ПСМА, содержит: первую вариательную область тяжелой цепи, содержащую: (а) последовательность CDR1 формулы:

G G S I S S X₁ X₂ Y X₃ (SEQ ID NO: 67),

где X₁ представляет собой S или N; X₂ представляет собой S или N; и X₃ представляет собой Y или F; и (b) последовательность CDR2 формулы:

X₄ X₅ X₆ S G X₇ T (SEQ ID NO: 68),

где X₄ представляет собой I или V; X₅ представляет собой D или Y; X₆ представляет собой Y или D; и X₇ представляет собой Y или S; и (c) представляет собой CDR3 формулы:

ARNKAATADFDY (SEQ ID NO: 69), и вторую вариательную область тяжелой цепи, содержащую:

(а) последовательность CDR1 формулы:

G F X₁ F X₂ X₃ Y G (SEQ ID NO: 70),

где X₁ представляет собой S или I, или T; X₂ представляет собой S или T, или R, или I; и X₃ представляет собой R или S; и (b) последовательность CDR2 формулы:

I X₄ Y D G S N X₅ (SEQ ID NO: 71),

где X₄ представляет собой W или S; и X₅ представляет собой R или K; и (c) последовательность CDR3 формулы:

AREPRX₆GYYYX₇X₈SGYX₉SLDY (SEQ ID NO: 72),

где X₆ представляет собой I или V; X₇ представляет собой E или D; X₈ представляет собой S или T; и X₉ представляет собой Y или D.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит первую и вторую вариательную область тяжелой цепи, причем первая вариательная область тяжелой цепи расположена ближе к N-концу относительно второй вариательной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления первая вариательная область тяжелой цепи расположена ближе к C-концу относительно второй вариательной области тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антитела, которое связывается с ПСМА, содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека, где последовательности CDR содержат последовательность, имеющую две или менее замен в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с ПСМА, содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека, где последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-23.

В некоторых вариантах осуществления антитела, которое связывается с ПСМА, содержит: вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18 в каркасе VH человека.

В некоторых вариантах осуществления антитела, которое связывается с ПСМА, содержит: вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18 в каркасе VH человека в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

61 в каркасе VH человека; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 64 в каркасе VL человека; и (iii) антигенсвязывающий домен антитела, содержащего только тяжелой цепи, к ПСМА, где антигенсвязывающий домен содержит первую и вторую антигенсвязывающую область в двухвалентной конфигурации, при этом: первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18 в каркасе VH человека; и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 20 в каркасе VH человека. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область расположена ближе к N-концу относительно второй антигенсвязывающей области. В определенных других вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область расположена ближе к C-концу по сравнению со второй антигенсвязывающей областью.

Аспекты изобретения включают полиспецифические или биспецифические антитела, в которых первая и вторая антигенсвязывающие области антигенсвязывающего домена антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ПСМА соединены полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой GS-линкер. В некоторых вариантах осуществления GS-линкер состоит из последовательности SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ПСМА является монопаратопным и индуцирует меньшую продукцию цитокинов по сравнению с бипаратопным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен антитела, содержащего только тяжелые цепи, в ПСМА является монопаратопным и увеличивает количество CD8+ Т-клеток в большей степени, чем бипаратопный антигенсвязывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления антитело является бипаратопным и имеет повышенную аффинность к ПСМА по сравнению с монопаратопным антителом к ПСМА. В некоторых вариантах осуществления антитело является бипаратопным и имеет повышенную эффекторную функцию по сравнению с монопаратопным антителом к ПСМА.

Аспекты изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим описанное в данном документе антитело.

Аспекты изобретения относятся к способам лечения расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА, включающим введение субъекту с указанным расстройством антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В определенных других аспектах изобретение относится к применению описанного в данном документе антитела при приготовлении лекарственного препарата для лечения расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА. В еще других аспектах изобретение относится к описанному в данном документе антителу для применения при лечении расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА. В определенных других аспектах изобретение относится к способам лечения, включающим введение нуждающемуся человеку эффективной дозы антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Что касается этих аспектов и в некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой злокачественное новообразование предстательной железы.

Аспекты изобретения относятся к полинуклеотидам, кодирующим описанное в данном документе антитело, векторам, содержащим такие полинуклеотиды, и клеткам, содержащим такие векторы.

Аспекты изобретения относятся к способам получения описанного в данном документе антитела, включающим культивирование описанной в данном документе клетки в условиях, допускающих экспрессию антитела, и выделение антитела из клетки.

Аспекты изобретения относятся к способам получения описанного в данном документе антитела, включающим иммунизацию животного UniRat белком ПСМА и идентификацию последовательностей ПСМА-связывающих антител.

Данные и другие аспекты будут дополнительно объяснены в остальной части описания, включая примеры.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1, панели А-В, представлена серия графиков, демонстрирующих титр сыворотки в зависимости от разведения.

На фиг. 2, панели А, представлен график, демонстрирующий связывание клеток с ПСМА человека.

На фиг. 2, панели В, представлен график, демонстрирующий связывание клеток с ПСМА яванского макака.

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий конкуренцию связывания между двумя семействами антител в соответствии с вариантом осуществления изобретения.

На фиг. 4, панели А, представлен график Скэтчарда, демонстрирующий аффинность связывания с ПСМА, экспрессируемым на клеточной поверхности, биспецифического антитела, имеющего аффинность связывания с CD3 и ПСМА, где плечо к ПСМА является монопаратопным и одновалентным согласно варианту осуществления изобретения.

На фиг. 4, панели В, представлен график Скэтчарда, демонстрирующий аффинность связывания с ПСМА, экспрессируемым на клеточной поверхности, биспецифического антитела, имеющего аффин-

ность связывания с CD3 и ПСМА, где плечо к ПСМА является бипаратопным согласно варианту осуществления изобретения.

На фиг. 5, панели А-С, представлены схематические изображения: анти-CD3 x одновалентного моноспецифического анти-ПСМА антитела (панель А); анти-CD3 x двухвалентное моноспецифическое анти-ПСМА антитело (панель В); и анти-CD3 x двухвалентное бипаратопное анти-ПСМА антитело (панель С) в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

На фиг. 6 представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток с использованием предварительно активированных Т-клеток.

На фиг. 7 представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток с использованием нестимулированных Т-клеток.

На фиг. 8 представлен график, изображающий процент специфического лизиса ПСМА-отрицательных клеток DU145 в зависимости от концентрации полиспецифических антител в присутствии предварительно активированных Т-клеток.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий связывание биспецифических антител к ПСМА x CD3 с положительными и отрицательными по ПСМА клетками.

На фиг. 10 представлен график, демонстрирующий опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток.

На фиг. 11, панели А, представлен график, изображающий пролиферацию Т-клеток в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 11, панели В, представлен график, изображающий пролиферацию Т-клеток в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 11, панели С, представлен график, изображающий отношение CD8 к CD4 пролиферируемых Т-клеток.

На фиг. 11, панели D, представлен график, изображающий отношение CD8 к CD4 пролиферируемых Т-клеток.

На фиг. 12, панели А, представлен график, изображающий опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 12, панели В, представлен график, изображающий высвобождение цитокина (ИФН- γ) в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 12, панели С, представлен график, изображающий высвобождение цитокина (ИЛ-2) в зависимости от концентрации антитела.

На фиг. 13 представлен график, изображающий ингибирование роста опухоли 22Rv1 в модели ксенотрансплантата опухоли.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

При практической реализации данного изобретения применяют, если не указано иное, стандартные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы полностью описаны в литературе, например, в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

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

Для обеспечения полного понимания данного изобретения в нижеследующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может применяться на практике и без одной или более указанных конкретных деталей. В других случаях общеизвестные отличительные признаки и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны во избежание затруднения понимания изобретения.

Все приведенные в данном документе ссылки, включая патентные заявки и публикации, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

I. Определения.

Под термином "содержащий" подразумевается, что перечисленные элементы требуются для композиции/способа/набора, однако для формирования композиции/способа/набора и тому подобного в рамках формулы изобретения могут быть включены и другие элементы.

Под термином "состоящий по существу из" подразумевается ограничение рамок описанной композиции или способа указанными материалами или поэтапными действиями, не оказывающими существенного влияния на основную и новую характеристику(и) объекта изобретения.

Под термином "состоящий из" подразумевается исключение любого элемента, поэтапного действия или ингредиента, не указанного в формуле изобретения, из композиции, способа или набора.

Остатки антител в данном документе нумеруются в соответствии с системой нумерации Kabat и системой нумерации EU. Система нумерации Kabat в общем случае используется для обозначения остатка в переменном домене (приблизительно остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed.

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации EU" или "индекс EU", как правило, используется для обозначения аминокислотного остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, представленный в Kabat et al., ранее). "Индекс EU по Kabat" относится к нумерации аминокислотных остатков антитела человека IgG1 EU. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в переменном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации Kabat. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU.

Антитела, также называемые иммуноглобулинами, как правило, содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, где N-концевой домен тяжелой и легкой цепей является переменным по последовательности, поэтому, как правило, его называют доменом переменной области или переменным доменом тяжелой цепи (VH) или переменным доменом легкой цепи (VL). Эти два домена, как правило, связываются с образованием области специфического связывания, хотя, как будет обсуждаться в данном документе, специфическое связывание также может быть получено с переменными последовательностями только тяжелых цепей, а в данной области техники известны и используются различные неприродные конфигурации антител.

"Функциональное" или "биологически активное" антитело или антигенсвязывающая молекула (включая антитела, содержащие только тяжелые цепи, и полиспецифические (например, биспецифические) трехцепочечные антителоподобные молекулы (ТСА, описанные в данном документе), является молекулой, способной оказывать одно или более своих природных активностей действий в структурных, регуляторных, биохимических или биофизических событиях. Например, функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, может обладать способностью специфически связывать антиген, а связывание может, в свою очередь, вызывать или изменять клеточное или молекулярное событие, такое как передача сигнала или ферментативная активность. Функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, также может блокировать лигандную активацию рецептора или действовать в качестве агониста или антагониста. Способность антитела или другой связывающей молекулы, например, ТСА, проявлять одну или более своих природных активностей, зависит от нескольких факторов, включая правильный фолдинг и сборку полипептидных цепей.

Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мономеры, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела, содержащие только тяжелые цепи, трехцепочечные антитела, ТСА, одноцепочечный Fv (scFv), наноантитела и т.д., а также включают фрагменты антител, если они проявляют желаемую биологическую активность (Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов.

Термин "антитело" может относиться к полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи, интактной молекуле иммуноглобулина; или иммунологически активной части любого из этих полипептидов, то есть к полипептиду, который содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген представляющей интерес мишени или ее часть, причем такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые вырабатывают аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Описанный в данном документе иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина, включая сконструированные подклассы с измененными Fc-частями, которые обеспечивают снижение или усиление активности эффекторных клеток. Легкие цепи рассматриваемых антител могут быть легкими цепями каппа (V-каппа) или легкими цепями ламбда (V-лямбда). Иммуноглобулины могут быть получены из любых видов. В одном аспекте иммуноглобулин имеет преимущественно человеческое происхождение.

Термин "моноклональное антитело" в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции

являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одиночной детерминанты на антигене. Моноклональные антитела в соответствии с данным изобретением могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, также могут быть получены, например, способами получения рекомбинантного белка (см., например, патент США № 4816567).

Термин "вариабельный", в контексте данного документа, в связи с антителами относится к тому факту, что последовательности некоторых частей вариабельных доменов антитела сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по вариабельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями. Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Вариабельные домены нативных легких и тяжелых цепей содержат по четыре FR, преимущественно принимающих конфигурацию Р-листа и соединенных тремя гипервариабельными областями, образующими петли, соединяющие структуры Р-типа, а в некоторых случаях, являющиеся их частью. Гипервариабельные области каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости при помощи FR и, вместе с гипервариабельными областями другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Термин "гипервариабельная область" при применении в данном документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из остатков "гипервариабельной петли" 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления "CDR" означает определяющую комплементарность область антитела, как определено в Lefranc, MP et al., *IMGT, the international Immunogenetics database, Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области/CDR, как определено в данном документе.

Примерные обозначения CDR показаны в данном документе, однако специалист в данной области техники поймет, что обычно используется ряд определений CDR, включая определение Kabat (см. "Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions". *Mol Immunol.* 2010; 47:694-700), которое основано на изменчивости последовательности и является наиболее часто используемым. Определение Chothia основано на расположении областей структурных петель (Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions". *Nature.* 1989; 342:877-883). Представляющие интерес альтернативные определения CDR включают, без ограничения, те, которые раскрыты Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes." *J Immunol.* 2008; 181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires". *J Mol Recognit.* 2004; 17:132-143; и Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies". *Faseb J.* 1995; 9:133-139, содержание каждого из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Термины "антитело, содержащее только тяжелые цепи" и "антитело, состоящее из тяжелых цепей" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к антителам или одной или более частям антитела, например, одному или более плечам антитела, в которых отсутствует легкая цепь обычного антитела. Термины, в частности, включают, без ограничения, гомодимерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен VH и константные домены CH2 и CH3, в отсутствие домена CH1; функциональные (антигенсвязывающие) варианты таких антител, растворимые варианты VH, Ig-NAR, содержащие гомодимер одного вариабельного домена (V-NAR) и пяти С-подобных константных доменов (C-NAR), и их функциональные фрагменты; и растворимые однодоменные антитела (sUniDab™). В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена вариабельной области, состоящего из каркаса 1, CDR1, каркаса 2, CDR2, каркаса 3, CDR3 и каркаса 4. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые

цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов CH2, и CH3. В еще одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена по меньшей мере части шарнирной области и домена CH2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена CH3. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, у которых домен CH2 и/или CH3 укорочен, также включены в данный документ. В другом варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена CH (CH1, CH2, CH3 или CH4), но без шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи дисульфидно связаны друг с другом, ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но также в данном документе включены антитела, относящиеся к другим подклассам, таким как подкласс IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности подтип IgG1. В одном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, в данном документе используются в качестве связывающего (нацеливающего) домена химерного антигенного рецептора (CAR). Определение, в частности, включает антитела человека, содержащие только тяжелые цепи, называемые UniAb™, продуцируемые трансгенными крысами с иммуноглобулином человека (UniRat™). Варибельные области (VH) UniAb™ называют UniDab™, и являются универсальными строительными блоками, которые могут быть связаны с областями Fc или сывороточным альбумином для разработки новых терапевтических средств с полиспецифичностью, повышенной эффективностью и увеличенным периодом полужизни. Поскольку гомодимерные UniAb™ лишены легкой цепи и, следовательно, домена VL, антиген распознается одним единственным доменом, то есть варибельным доменом тяжелой цепи антитела, содержащего только тяжелые цепи, (VH или VHH).

Используемый в данном документе термин "интактная цепь антитела" представляет собой цепь, содержащую полноразмерную варибельную область и полноразмерную константную область (Fc). Интактное "стандартное" антитело содержит интактную легкую цепь и интактную тяжелую цепь, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, шарнир, CH2 и CH3 для секретируемого IgG. Другие изоформы, такие как IgM или IgA, могут иметь разные домены CH. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или их варианты аминокислотной последовательности. Интактное антитело может иметь одну или более "эффекторных функций", которые относятся к той биологической активности, которая присуща константной области Fc (области Fc с нативной последовательностью или области Fc с вариантной аминокислотной последовательностью) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; и снижение количества рецепторов клеточной поверхности. Варианты константной области включают те, которые изменяют эффекторный профиль, связывание с Fc-рецепторами и т.п.

В зависимости от аминокислотной последовательности Fc (константного домена) их тяжелых цепей, антитела и различные антигенсвязывающие белки могут быть определены в разные классы. Существует пять основных классов областей Fc тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изоформы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, и IgA2. Константные домены Fc, которые соответствуют различным классам антител, могут обозначаться как α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Формы Ig включают шарнирные модификации или бесшарнирные формы (Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Легкие цепи антител от любых вида позвоночных можно отнести к одному из двух типов, называемых κ (каппа) и λ (лямбда), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитела в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут содержать последовательности легкой каппа-цепи или последовательности легкой лямбда-цепи.

"Функциональная область Fc" обладает "эффекторной функцией" области Fc с нативной последовательностью. Неограничивающие примеры эффекторных функций включают связывание C1q; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; АЗКФ; снижение количества рецепторов на поверхности клетки (например, В-клеточного рецептора) и т.д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы область Fc взаимодействовала с рецептором, например, рецепторами Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB, и рецептором FcRn с низкой аффинностью; и могут быть оценены с помощью различных анализов, известных в данной области техники. "Мертвый" или "подвергнутый сайленсингу" Fc представляет собой Fc, который был мутирован для сохранения активности в отношении, например, продления периода полужизни в сыворотке, но который не активирует высокоаффинный Fc-рецептор или который имеет сниженную аффинность к Fc-рецептору.

"Область Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность,

идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. Человеческие области Fc с нативной последовательностью включают, например, область Fc человеческого IgG1 с нативной последовательностью (не-A- и A-аллотипы); область Fc человеческого IgG2 с нативной последовательностью; область Fc человеческого IgG3 с нативной последовательностью; и область Fc человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

"Вариант области Fc" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности области Fc с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной модификации аминокислоты, предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно вариант области Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с областью Fc с нативной последовательностью или с областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в области Fc с нативной последовательностью или в области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc в данном документе предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% гомологией с областью Fc с нативной последовательностью и/или с областью Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% гомологии с ними, более предпочтительно по меньшей мере около 95 % гомологии с ним.

Варианты последовательностей Fc могут содержать три аминокислотные замены в области CH2 для снижения связывания FcγRI в положениях 234, 235, и 237 согласно индексу EU (см. Duncan et al., (1988) Nature 332:563). Две аминокислотные замены в сайте связывания комплемента C1q в положениях 330 и 331 согласно индексу EU снижают фиксацию комплемента (см. Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993) и Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). Замена на остатки человеческого IgG1 или IgG2 в положениях 233-236 и остатки IgG4 в положениях 327, 330 и 331 значительно снижает АЗКЦ и КЗЦ (см., например, Armour K.L. et al., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; и Shields R.L. et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Аминокислотная последовательность Fc IgG4 человека (UniProtKB № P01861) представлена в данном документе как SEQ ID NO: 76. Подвергнутый сайленсингу IgG1 описан, например, в Boesch, A.W., et al., "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions". MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27, описание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Возможны и другие варианты Fc, включая, без ограничения, вариант, в котором удалена область, способная образовывать дисульфидную связь, или в котором удалены определенные аминокислотные остатки на N-конце нативного Fc, или остаток метионина добавлен к нему. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления одна или более Fc-частей антитела могут содержать одну или более мутаций в шарнирной области для устранения дисульфидной связи. В еще одном варианте осуществления шарнирная область Fc может быть удалена полностью. В еще одном варианте осуществления антитело может содержать вариант Fc.

Кроме того, вариант Fc может быть сконструирован для удаления или существенного снижения эффекторных функций путем замены (мутации), удаления или добавления аминокислотных остатков для осуществления связывания комплемента или связывания Fc-рецептора. Например, без ограничения, деления может происходить в сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q. Способы получения таких производных последовательностей Fc-фрагмента иммуноглобулина описаны в международных патентных публикациях №№ WO 97/34631 и WO 96/32478. Кроме того, Fc-домен может быть модифицирован фосфорилированием, сульфированием, ацилированием, гликозилированием, метилированием, фарнезилированием, ацетилированием, амидированием и т.п.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариантную последовательность домена CH3 IgG4 человека, содержащую мутацию T366W, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью выступа CH3 IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариантную последовательность домена CH3 IgG4 человека, содержащую мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V, которая необязательно может называться в данном документе последовательностью впадины CH3 IgG4. Описанные в данном документе мутации IgG4 CH3 можно использовать любым подходящим способом, чтобы поместить "выступ" в константную область первой тяжелой цепи первого мономера в димере антитела и "впадину" в константной области второй тяжелой цепи второго мономера в димере антитела, способствуя тем самым правильному спариванию (гетеродимеризации) желаемой пары полипептидных субъединиц тяжелой цепи в антителе.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариантную область Fc IgG4 человека, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариантную область Fc IgG4 человека, содержащую мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина).

Термин "антитело, содержащее область Fc" относится к антителу, которое содержит область Fc. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время очистки антитела или путем конструирования рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело.

Соответственно, антитело, имеющее область Fc согласно данному изобретению, может включать

антитело с или без К447.

Аспекты изобретения включают антитела, содержащие вариабельную область только тяжелой цепи, в одновалентной или двухвалентной конфигурации. Используемый в данном документе термин "одновалентная конфигурация", используемый в отношении домена вариабельной области только тяжелой цепи, означает, что присутствует только один домен вариабельной области только тяжелой цепи, имеющий единственный сайт связывания (см. фиг. 5, панель А, правое плечо антитела). Напротив, термин "двухвалентная конфигурация", используемый в отношении домена вариабельной области только тяжелой цепи, означает, что присутствуют два домена вариабельной области только тяжелой цепи (каждый из которых имеет один сайт связывания) и соединены линкерной последовательностью (см. фиг. 5, панели В и С, правые плечи антител). Неограничивающие примеры линкерных последовательностей дополнительно обсуждаются в данном документе и включают, без ограничения, последовательности GS-линкеров различной длины. Когда вариабельная область только тяжелой цепи имеет двухвалентную конфигурацию, каждый из двух доменов вариабельной области только тяжелой цепи может иметь аффинность связывания с одним и тем же антигеном или с разными антигенами (например, с разными эпитопами на одном и том же белке; с двумя разными белками и т.д.). Однако, если специально не указано иное, вариабельная область только тяжелой цепи, обозначенная как находящаяся в "двухвалентной конфигурации", как предполагается, содержит два идентичных домена вариабельной области только тяжелой цепи, соединенные линкерной последовательностью, при этом каждая из двух идентичных доменов вариабельных областей только тяжелой цепи, обладают аффинностью связывания с одним и тем же целевым антигеном.

Аспекты изобретения включают антитела, имеющие полиспецифические конфигурации, которые включают, без ограничения, биспецифические, триспецифические и т.д. Большое разнообразие способов и конфигураций белков известно и используется для получения биспецифических моноклональных антител (бсмкАт), триспецифических антител, и т.п.

Были разработаны различные способы получения поливалентных искусственных антител путем рекомбинантного слияния вариабельных доменов двух или более антител. В некоторых вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающий домен на полипептиде соединены полипептидным линкером. Одним неограничивающим примером такого полипептидного линкера является GS-линкер, имеющий аминокислотную последовательность из четырех остатков глицина, за которыми следует один остаток серина, и в котором последовательность повторяется p раз, где p представляет собой целое число от 1 до около 10, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или 9 (SEQ ID NO: 94). Неограничивающие примеры таких линкеров включают GGGGS (SEQ ID NO: 73) ($n=1$) и GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74) ($n=2$). Также можно использовать другие подходящие линкеры, которые описаны, например, в Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 October 15; 65 (10): 1357-69, описание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Термин "трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" используется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, включающих, состоящих по существу или состоящих из трех полипептидных субъединиц, две из которых содержат, состоят по существу из или состоят из одной тяжелой и одной легкой цепи моноклонального антитела, или функциональных антигенсвязывающих фрагментов таких цепей антитела, содержащих антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН. Данная пара тяжелая цепь / легкая цепь обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена. Третья полипептидная субъединица включает, состоит по существу из или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащую домены СН2 и/или СН3, и/или СН4, в отсутствие домена СН1, и один или более антигенсвязывающих доменов (например, два антигенсвязывающих домена), который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, причем такой связывающий домен получен из или имеет идентичность последовательности с вариабельной областью тяжелой или легкой цепи антитела. Части такой вариабельной области могут кодироваться сегментами гена V_H и/или V_L , сегментами гена D и J_H , или сегментами гена J_L . Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L или V_LJ_L .

В соединении, связывающем ТСА, используется "антитело, содержащее только тяжелые цепи", или "антитело, состоящее из тяжелых цепей", или "полипептид, содержащий только тяжелые цепи", которые, как используется в данном документе, означают одноцепочечное антитело, содержащее константные области тяжелой цепи СН2 и/или СН3, и/или СН4, но без домена СН1. В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов СН2, и СН3. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, у которых домен СН2 и/или СН3 укорочен, также включены в данный документ. В другом варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но без шарнирной

области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью, другие в противном случае ковалентно или нековалентно связаны друг с другом, и может необязательно включать асимметричную поверхность взаимодействия между одним или более доменами СН, чтобы облегчить правильное спаривание между полипептидными цепями. Антитело из тяжелых цепей может принадлежать к подклассу IgG, но сюда также включены антитела, принадлежащие к другим подклассам, таким как подкласс IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности подтипу IgG1 или подтипу IgG4. Неограничивающие примеры соединения, связывающего ТСА, описаны, например, в WO2017/223111 и WO2018/052503, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела, состоящий только из тяжелых цепей составляют около четверти антител IgG, продуцируемых животными семейства верблюдовых, например, верблюдами и ламами (Hamers-Casterman C., et al. *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Эти антитела образованы двумя тяжелыми цепями, но лишены легких цепей. Как следствие, варибельный участок связывания антигена называется доменом VHH, и он представляет собой наименьший естественный, интактный антигенсвязывающий сайт, имеющий длину всего около 120 аминокислот (Desmyter, A., et al. *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Антитела, содержащие только тяжелые цепи, с высокой специфичностью и аффинностью могут создаваться против различных антигенов посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), а часть VHH может быть легко клонирована и экспрессирована в дрожжах (Frenken, L.G.J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). Также было показано, что у акул есть один VH-подобный домен в своих антителах, называемый VNAR. (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

Используемый в данном документе термин "ПСМА" относится к трансмембранному белку типа II, который обладает активностью N-ацетилированной альфа-связанной кислотной дипептидазы, фолатгидролазы и дипептидилпептидазы. Термин "ПСМА" включает белок ПСМА человека и любого отличного от человека вида животных и, в частности, включает ПСМА человека, а также ПСМА отличных от человека млекопитающих.

Используемый в данном документе термин "ПСМА человека" включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи ПСМА человека (UniProt Q04609), независимо от его источника или способа получения. Таким образом, "ПСМА человека" включает ПСМА человека, естественно экспрессируемый клетками, и ПСМА, экспрессируемый на клетках, трансфицированных геном ПСМА человека.

Термины "антитело, содержащее только тяжелые цепи, к ПСМА", "антитело, состоящее только из тяжелых цепей, к ПСМА", "анти-ПСМА антитело, содержащее только тяжелые цепи" и "антитело к ПСМА, состоящее только из тяжелых цепей" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего только тяжелые цепи, как определено выше, для иммуноспецифического связывания с ПСМА, включая ПСМА человека, как определено выше. Определение включает, без ограничения, человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, включая UniRat™, продуцирующие человеческие антитела UniAb™ к ПСМА, как определено выше.

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей данного изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей генерируются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2.

"Выделенным" антителом является такое, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественной среды. Загрязняющий компонент естественного окружения представляет собой вещества, которые влияют на диагностическое или терапевтическое применение антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более 95 мас.% антитела, как определено методом Лоури, и наиболее предпочтительно более 99 мас.%, (2) до степени, достаточ-

ной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности путем ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием красителя Кумасси синего или, предпочтительнее, красителя на основе серебра. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Антитела по изобретению включают полиспецифические антитела. Полиспецифические антитела имеют более чем одну специфичность связывания. Термин "полиспецифический", в частности, включает "биспецифический" и "триспецифический", а также аффинность независимого специфического связывания высшего порядка, такую как полиэпитопная специфичность высшего порядка, а также тетравалентные антитела и фрагменты антител. Термины "полиспецифическое антитело", "полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "полиспецифическое антитело, состоящее только из тяжелых цепей" и "полиспецифическое UniAb™" используются в данном документе в самом широком смысле и охватывают все антитела с более чем одной специфичностью связывания. Полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА по настоящему изобретению, в частности, включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися эпитопами на белке ПСМА, таком как ПСМА человека (т.е. двухвалентные и бипаратопные). Полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА согласно настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом белка ПСМА, таким как ПСМА человека, и эпитопом другого белка, такого как, например, белок CD3, такой как CD3 человека (т.е. двухвалентные и бипаратопные). Полиспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися или частично перекрывающимися эпитопами на белке ПСМА, таком как белок ПСМА человека, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как белок CD3 человека (т.е. трехвалентный и бипаратопный).

Антитела согласно изобретению включают моноспецифические антитела, имеющие одну специфичность связывания. Моноспецифические антитела, в частности, включают антитела, обладающие одной специфичностью связывания, а также антитела, содержащие более одной единицы связывания, имеющие одинаковую специфичность связывания. Термины "моноспецифическое антитело", "моноспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "моноспецифическое антитело, состоящее из тяжелых цепей" и "моноспецифическое UniAb™" используются в данном документе в самом широком смысле и охватывают все антитела с одной специфичностью связывания. Моноспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА по настоящему изобретению, в частности, включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с одним эпитопом на белке ПСМА, таким как ПСМА человека (одновалентный и моноспецифический). Моноспецифические антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, имеющие более одной связывающей единицы (например, поливалентные антитела), иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке ПСМА, таком как ПСМА человека. Например, моноспецифическое антитело в соответствии с вариантами осуществления изобретения может содержать варибельную область тяжелой цепи, содержащую два антигенсвязывающих домена, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с одним и тем же эпитопом на белке ПСМА (т.е. двухвалентным и моноспецифическим).

"Эпитоп" представляет собой участок на поверхности молекулы антигена, с которым связывается одна молекула антитела. Обычно антиген имеет несколько или много разных эпитопов и вступает в реакцию со многими различными антителами. Термин, в частности, включает линейные эпитопы и конформационные эпитопы.

"Эпитопное картирование" представляет собой процесс идентификации сайтов связывания или эпитопов антител на их целевых антигенах. Эпитопы антител могут быть линейными или конформационными эпитопами. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин "полиэпитопная специфичность" относится к способности специфически связываться с двумя или более различными эпитопами на одной или разных мишенях. Как отмечалось выше, настоящее изобретение, в частности, включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА с полиэпитопной специфичностью, то есть антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА, связывающиеся с одним или более неперекрывающимися эпитопами на белке ПСМА, таком как ПСМА человека; и антитела, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА, связывающиеся с одним или более эпитопами на белке ПСМА и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3. Термин "неперекрывающийся эпитоп(ы)" или "неконкурентный эпитоп(ы)" антигена определяется в данном документе как начинающий эпитоп(ы), которые распознаются одним членом пары антигенспецифических антител, но не другим членом. Пары антител или антигенсвязывающие области, нацеленные на один и тот же антиген

на полиспецифическом антителе, распознающие неперекрывающиеся эпитопы, не конкурируют за связывание с этим антигеном и способны одновременно связывать этот антиген.

Антитело связывает "по существу тот же эпитоп", что и эталонное антитело, когда два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко используемыми и быстрыми способами для определения того, связываются ли два эпитопа с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются анализы конкурентного связывания, которые могут быть сконфигурированы во всем количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизуют в 96-луночной планшете, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток.

Термин "валентный", в контексте данного документа, относится к указанному количеству сайтов связывания в молекуле антитела.

"Моновалентное" антитело имеет один сайт связывания. Таким образом, одновалентное антитело также является моноспецифическим.

"Поливалентное" антитело имеет два или более сайтов связывания. Таким образом, термины "двухвалентный", "трехвалентный" и "четырёхвалентный" относятся к наличию двух сайтов связывания, трех сайтов связывания и четырех сайтов связывания, соответственно. Таким образом, биспецифическое антитело по изобретению является по меньшей мере двухвалентным и может быть трехвалентным, четырехвалентным или иным образом мновалентным. Двухвалентное антитело в соответствии с вариантами осуществления изобретения может иметь два сайта связывания с одним и тем же эпитопом (т.е. двухвалентное, монопаратопное) или с двумя разными эпитопами (т.е. двухвалентное, бипаратопное).

Известно большое разнообразие способов и конфигураций белка и используется для получения биспецифических моноклональных антител (бсмаАт), триспецифических антител и тому подобного.

Термин "биспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" используется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, включающих, состоящих по существу или состоящих из трех полипептидных субъединиц, две из которых содержат, состоят по существу из или состоят из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи моноклонального антитела, или функциональных антигенсвязывающих фрагментов таких цепей антитела, содержащих антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН. Данная пара тяжелая цепь / легкая цепь обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена. Третья полипептидная субъединица содержит, состоит по существу или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащий домены СН2 и/или СН3, и/или СН4, в отсутствие домена СН1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, причем такой связывающий домен происходит из или имеет идентичность последовательности с вариабельной областью тяжелой или легкой цепи антитела. Части такой вариабельной области могут кодироваться сегментами гена V_H и/или V_L, сегментами гена D и J_H, или сегментами гена J_L. Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L или V_LJ_L. В белке ТСА используется антитело, содержащее только тяжелые цепи, как определено выше.

Термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" используется в данном описании в самом широком смысле для обозначения сконструированного рецептора, который прививает желаемую специфичность связывания (например, антигенсвязывающую область моноклонального антитела или другого лиганда) к охватывающему мембрану и внутриклеточному сигнальному доменам. Как правило, рецептор используется для прививки специфичности моноклонального антитела Т-клетке для создания химерных антигенных рецепторов (CAR). (J Natl Cancer Inst, 2015; 108(7):dvj439; and Jackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13:370-383). CAR-Т-клетки представляют собой Т-клетки, которые были генетически модифицированы для продукции искусственного Т-клеточного рецептора для применения в иммунотерапии. В одном варианте осуществления "CAR-Т-клетка" означает терапевтическую Т-клетку, экспрессирующую трансген, кодирующий один или более химерных антигенных рецепторов, состоящих минимально из внеклеточного домена, трансмембранного домена и по меньшей мере одного цитозольного домена.

Термин "человеческое антитело" используется в данном документе для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела по данному документу могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека, например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*. Термин "человеческое антитело", в частности, включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, имеющие последовательности вариабельной области тяжелой цепи человека, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или мыши, в частности UniAb™, продуцируемые UniRat™, как определено выше.

Под "химерным антителом" или "химерным иммуноглобулином" подразумевается молекула иммуноглобулина, содержащая аминокислотные последовательности по меньшей мере из двух разных локусов Ig, например, трансгенное антитело, содержащее часть, кодируемую локусом Ig человека, и часть,

кодируемую локусом Ig крысы. Химерные антитела включают трансгенные антитела с нечеловеческими областями Fc или искусственными областями Fc, и человеческие идиотипы. Такие иммуноглобулины могут быть выделены из животных согласно изобретению, которые были сконструированы для получения таких химерных антител.

Используемый в данном документе термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от когнитивной и активационной фаз иммунного ответа. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, такая как естественная клетка-киллер, способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Например, моноциты и макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток-мишеней и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы или связывании с клетками, которые презентуют антигены. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень или клетку-мишень.

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют рецепторы, такие как T-клеточные рецепторы или FcR, и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно, такие клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают, естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические T-клетки и нейтрофилы; причем NK-клетки являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови или МКПК, как описано в данном документе.

Термин "иммунная клетка" используется в данном документе в самом широком смысле, включая, без ограничения, клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоциты (такие как B-клетки и T-клетки, включая цитолитические T-клетки (ЦТЛ)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфно-ядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы.

"Эффекторные функции" антитела относятся к той биологической активности, которая относится к области Fc (нативной последовательности области Fc или варианта аминокислотной последовательности области Fc) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов поверхности клетки, (например, B-клеточный рецептор, BCR) и т.д.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "АЗКЦ" соответствуют опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на с. 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации dunes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "КЗЦ" относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента, может быть выполнен анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

"Аффинность связывания" относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом можно выразить константой диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена общепринятыми способами, известными в данной области техники. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно и склонны легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными.

Используемый в данном документе термин "Kd" или "значение Kd" относится к константе диссоциации, определенной методом интерферометрии BioLayer, с использованием прибора Octet QK384 (Fortebio Inc., Menlo Park, CA) в режиме кинетики. Например, сенсоры с антителом к Fc мыши загружают

со слитым Fc-антигеном мыши и затем погружают в лунки, содержащие антитела, для измерения зависимых от концентрации скоростей (kon). Скорости диссоциации антител (koff) измеряют на последней стадии, когда сенсоры погружают в лунки, содержащие только буфер. Kd представляет собой соотношение koff/kon (подробнее см. Conception, J., et al., Comb Chem High Throughput Screen, 12(8), 791-800, 2009).

Термины "лечение", "лечить" и тому подобное используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного явления, связанного с этим заболеванием. Используемый в данном документе термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего и включает: (а) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано; (б) подавление заболевания, то есть прекращение его развития; или (с) облегчение заболевания, т.е. вызывание регресса заболевания. Терапевтический агент может быть введен до, во время или после начала заболевания или травмы. Лечение продолжающегося заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение желательно проводить до полной потери функции в пораженных тканях. Терапия у субъекта может быть проведена во время симптоматической стадии заболевания, и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество активного агента, которое необходимо для придания терапевтического эффекта у субъекта. Например, "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое вызывает, ослабляет или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, связанных с заболеванием, или которое повышает устойчивость к расстройству.

Используемый в данном документе термин "злокачественное новообразование предстательной железы" относится к злокачественной опухоли железистого происхождения в предстательной железе.

Термин "характеризуется экспрессией ПСМА" в широком смысле относится к любому заболеванию или расстройству, при котором экспрессия ПСМА связана или вовлечена в один или более патологических процессов, которые характерны для данного заболевания или расстройства. Такие расстройства включают, но не ограничиваются ими, злокачественное новообразование предстательной железы.

Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения млекопитающего, которого оценивают на предмет лечения и/или которое подвергается лечению. В одном варианте осуществления млекопитающее является человеком. Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" охватывают, без ограничения, индивидуумов, имеющих злокачественное новообразование, индивидуумов с аутоиммунными заболеваниями, патогенными инфекциями и тому подобное. Субъектами могут быть люди, но также могут быть и другие млекопитающие, в частности те млекопитающие, которые могут быть использованы в качестве лабораторных моделей заболеваний человека, например, мышь, крыса и т.д.

Термин "фармацевтический состав" относится к составу, который находится в такой форме, чтобы обеспечить биологическую активность активного ингредиента, чтобы быть эффективным, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Такие составы являются стерильными. "Фармацевтически приемлемые эксципиенты" (носители, адьюванты) являются таковыми, которые резонно могут вводиться субъекту-млекопитающему и обеспечивать эффективную дозу используемого активного ингредиента.

"Стерильная" композиция является асептической или свободной от, или практически не содержит любых живых микроорганизмов и их спор. "Замороженная" композиция является композицией при температуре ниже 0°C.

"Стабильная композиция" является таковой, в которой белок практически полностью сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность во время хранения. Предпочтительно, композиция практически полностью сохраняет свою физическую или химическую стабильность, а также свою биологическую активность. Период хранения в общем выбран на основании срока годности состава. Разнообразные техники для измерения стабильности белка известны в данной области техники и рассмотрены, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность может быть измерена при выбранной температуре для выбранного периода времени. Стабильность может быть оценена качественно и/или количественно различными способами, включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или путем визуального контроля); путем оценки гетерогенности заряда с помощью катионообменной хроматографии, капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре (icIEF) или электрофореза в капиллярной зоне; анализ N-концевой или C-концевой последовательности; масс-спектрометрический анализ; анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия для сравнения восстановленного и ин-

тактного антитела; анализ пептидной карты (например, триптический или LYS-C); оценку биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.п. Нестабильность может включать в себя одно или более из следующего: агрегация, дезамидирование (например, дезамидирование Asp), окисление (например, окисление Met), изомеризация (например, изомеризация Asp), отсечение / гидролиз / фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимида, неспаренный цистеин(ы), удлинение N-конца, обработка C-конца, различия гликозилирования, и т.п.

II. Подробное описание.

Антитела к ПСМА.

Настоящее изобретение относится к семейству близкородственных антител, которые связываются с ПСМА человека. Антитела этого семейства содержат набор последовательностей CDR, как определено в данном документе и показано в табл. 1, и проиллюстрированы предложенными последовательностями варибельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 24-54, приведенными в таблице 2. Семейство антител обеспечивает ряд преимуществ, которые благоприятствуют применению их в качестве клинического(их) терапевтического(их) агента(ов). Антитела включают членов с диапазоном аффинностей связывания, позволяющих выбрать конкретную последовательность с желаемой аффинностью связывания.

Таблица 1

Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ПСМА

SEQ aa_CDR1	SEQ aa_CDR2	SEQ aa_CDR3
GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
GGSISSSNFY (SEQ ID NO: 2)	VDYSGYT (SEQ ID NO: 12)	AREPRIGYYYESSGYDSLIDY (SEQ ID NO: 19)
GGSISSNSYY (SEQ ID NO: 3)	IYDSGST (SEQ ID NO: 13)	AREPRIGYYYESSGYSLIDY (SEQ ID NO: 20)
GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSLIDY (SEQ ID NO: 21)
GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYDSSGYSLIDY (SEQ ID NO: 22)
GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRVGYYYETSGYSLIDY (SEQ ID NO: 23)
GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNR (SEQ ID NO: 17)	
GFSFTSYG (SEQ ID NO: 8)		
GFTFISYG (SEQ ID NO: 9)		
GFTFSSYG (SEQ ID NO: 10)		

Таблица 2

Аминокислотные последовательности варибельного домена антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ПСМА

ID № клона	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
325920	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSSSYYWGWRQPPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHK AATADFDYRGQGLTVTVSS	24
346181	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSSNYFWGWRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHK AATADFDYRGQGLTVTVSS	25
346165	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSSSYYWGWRQPPGKGLEWIG SVDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHK AATADFDYRGQGLTVTVSS	26
346172	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSSSYYWGWRQPPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCARHK AATADFDYRGQGLTVTVSS	27
326109	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSNSYYWGWRQSPGKGLEWIG SIYDSGSTHYNPSLQSRVVISGDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHKA ATADFDYRGQGLTVTVSS	28
325867	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWDYDGSNKYYADSVKGRFTISRDKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYDSLIDYRGQGLTVTVSS	29
325742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV	30

	AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYDSLDIRGQGLTIVTSS	
325748	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	31
325940	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	32
325836	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGLTIVTSS	33
326027	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGLTIVTSS	34
326087	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGLTIVTSS	35
326084	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYDSSGYSLDIRGQGLTIVTSS	36
326028	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYDSSGYDSLDIRGQGLTIVTSS	37
345497	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWDGNSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	38
326029	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRVGYYYETSGYYSLDIRGQGLTIVTSS	39
345461	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	40
345493	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGNSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	41
345436	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	42
345443	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	43
345490	QVQLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	44
345482	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA VIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	45
345485	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC AREPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	46
345463	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPGKGPEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDIRGQGLTIVTSS	47
325932	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEGVA	48

	VIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	
345505	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPGKLEGVA VIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	49
345508	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKPEWV AVIWDGNSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	50
345480	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKLEWV AVIWDGNSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	51
326116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSRYGMHWVRQAPGKLEGV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYDSSGYDSLDRGQGLTVTVSS	52
345509	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKLEGVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	53
345444	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEGVA VIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	54
345421	QVQLVESVGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKLEGVA VIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	55
345447	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKLEGVA VISYDGSNRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE PRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	56
345510	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKLEWV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYC AREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	57
345438	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSYGMHWVRQAPGKPEWV AVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REPRIGYYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSS	58

Подходящее антитело может быть выбрано из представленных в данном документе антител для разработки и терапевтического или другого применения, включая, без ограничения, применение в качестве биспецифического, например, как показано на фиг. 5, панелях А-С, или триспецифического антитела или части структуры CAR-T. На фиг. 5 панели А-С представлены иллюстрации полиспецифических антител к CD3 x PCMA, где домен к PCMA является одновалентным и моноспецифическим, двухвалентным и моноспецифическим или двухвалентным и биспецифическим (бипаратопным). Домен к CD3 содержит домен CH1 и спарен с легкой цепью, в то время как домены к PCMA получены из антител, состоящих только из тяжелых цепей, и не содержат домен CH1 и не взаимодействуют с легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления две тяжелые цепи разделяют с использованием, например, технологии "выступы-во-впадины". Ссылаясь на антитела, изображенные на фиг. 5, на панели А показано биспецифическое антитело к CD3 x PCMA, в котором связывающее плечо к PCMA является одновалентным и моноспецифическим, а антигенсвязывающий домен плеча к PCMA находится в одновалентной конфигурации, что означает, что присутствует только один антигенсвязывающий домен. На панели В изображено биспецифическое антитело CD3 x PCMA, в котором связывающее плечо к PCMA является двухвалентным и моноспецифическим, а антигенсвязывающий домен плеча к PCMA находится в двухвалентной конфигурации, что означает, что есть два идентичных антигенсвязывающих домена, размещенных в тандеме. На панели С изображено биспецифическое антитело к CD3 x PCMA, в котором связывающее плечо к PCMA является двухвалентным и бипаратопным, а антигенсвязывающие домены плеча к PCMA находятся в двухвалентной конфигурации.

Определение аффинности к белку-кандидату может быть выполнено с использованием способов, известных в данной области техники, таких как измерения Вiasoge. Члены семейства антител могут иметь аффинность к PCMA с Kd, равным от около 10^{-6} до около 10^{-11} , включая, без ограничения: от около 10^{-6} до около 10^{-10} ; от около 10^{-6} до около 10^{-9} ; от около 10^{-6} до около 10^{-8} ; от около 10^{-8} до около 10^{-11} ; от около 10^{-8} до около 10^{-10} ; от около 10^{-8} до около 10^{-9} ; от около 10^{-9} до около 10^{-11} ; от около 10^{-9} до около 10^{-10} ; или любому значению в этих диапазонах. Выбор аффинности может быть подтвержден при помощи биологической оценки в отношении модуляции, например, блокирования, биологической активности PCMA, включая анализы *in vitro*, доклинические модели и клинические исследования, а также оценку потенциальной токсичности.

Члены семьи антител, описанные в данном документе, не являются перекрестно-реактивными с белком PCMA яванского макака, но могут быть сконструированными для обеспечения перекрестной-реактивности с белком PCMA яванского макака или белками PCMA других видов животных, при необходимости.

Семейство PCMA-специфических антител в данном документе включает домен VH, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека. Последовательности CDR могут быть

расположены, например, в области около аминокислотных остатков 26-33; 51-58; и 97-116 для CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, предоставленных иллюстративных последовательностей вариательной области, указанных в SEQ ID NO: 24-58. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что последовательности CDR могут находиться в других положениях, если выбрана другая каркасная последовательность, хотя, как правило, порядок последовательностей остается неизменным.

Последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 антител к ПСМА по данному изобретению могут охватываться следующими структурными формулами, где X обозначает вариательную аминокислоту, которая может представлять собой вариательную аминокислоту, как указано ниже.

CDR1

G G S I S S X₁ X₂ Y X₃ (SEQ ID NO: 67) где X₁ представляет собой S или N;

X₂ представляет собой S или N; и

X₃ представляет собой Y или F; и

CDR2

X₄ X₅ X, S G X₇ T (SEQ ID NO: 68) где X₄ представляет собой I или V;

X₅ представляет собой D или Y;

X₆ представляет собой Y или D; и

X₇ представляет собой Y или S; и

CDR3

ARNKAATADFDY (SEQ ID NO: 69).

Последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 антител к ПСМА по данному изобретению могут охватываться следующими структурными формулами, где X обозначает вариательную аминокислоту, которая может представлять собой вариательную аминокислоту, как указано ниже.

CDR1

G F X₁ F X₂ X₃ Y G (SEQ ID NO: 70) где X₁ представляет собой S или I, или T;

X₂ представляет собой S или T, или R, или I; и

X₃ представляет собой R или S; и

CDR2

I X₄ Y D G S N X₅ (SEQ ID NO: 71) где X₄ представляет собой W или S; и

X₅ представляет собой R или K; и

CDR3

AREPRX₆GYYYX₇X₈SGYX₉SLDY (SEQ ID NO: 72) где X₆ представляет собой I или V;

X₇ представляет собой E или D;

X₈ представляет собой S или T; и

X₉ представляет собой Y или D.

Типичные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 показаны в табл. 1 и 3.

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3
антитела, содержащего только тяжелые цепи, к ПСМА

ID № клона	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
325920	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
346181	GGSISSSNFY (SEQ ID NO: 2)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
346165	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	VDYSGYT (SEQ ID NO: 12)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
346172	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 1)	IDYSGYT (SEQ ID NO: 11)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
326109	GGSISSNSYY (SEQ ID NO: 3)	IYDSGST (SEQ ID NO: 13)	ARHKAATADFDY (SEQ ID NO: 18)
325867	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 19)
325742	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 19)
325748	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
325940	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
325836	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326027	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326087	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
326084	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 22)
326028	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRIGYYYDSSGYDSL DY (SEQ ID NO: 21)
345497	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
326029	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRVGYYYETSGYDSL DY (SEQ ID NO: 23)
345461	GFSFTSYG (SEQ ID NO: 8)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345493	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345436	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345443	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345490	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345482	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345485	GFSFRSYG (SEQ ID NO: 4)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
345463	GFIFRSYG (SEQ ID NO: 6)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)
325932	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYDSL DY (SEQ ID NO: 20)

345505	GFTFISYG (SEQ ID NO: 9)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345508	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345480	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
326116	GFSFSRYG (SEQ ID NO: 7)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 16)	AREPRIGYYDSSGYDSLIDY (SEQ ID NO: 21)
345509	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345444	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 10)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345421	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNR (SEQ ID NO: 15)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345447	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	ISYDGSNR (SEQ ID NO: 17)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345510	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)
345438	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 5)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 14)	AREPRIGYYYESSGYSLDY (SEQ ID NO: 20)

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность CDR1 любой из SEQ ID NO: 1-10. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 2 или 7.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность CDR2 с любой из SEQ ID NO: 11-17. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 11 или 15.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность CDR3 с любой из SEQ ID NO: 18-23. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 18 или 20.

В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, к ПСМА содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2; последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11; и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18.

В дополнительном варианте осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 7; последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 15; и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 20.

В дополнительном варианте осуществления антитело к ПСМА содержит любую из аминокислотных последовательностей вариательной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 24-58 (табл. 2).

В еще одном варианте осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 25.

В еще одном варианте осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в антителе к ПСМА по изобретению содержит одну или две аминокислотные замены относительно последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 или набора последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 в любой из SEQ ID NO: 1-23 (табл. 1).

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА предпочтительно содержит вариательный домен тяжелой цепи (VH), в котором последовательность CDR3 имеет более или равную 80%, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности на аминокислотном уровне с последовательностью CDR3 любого из антител, чьи последовательности CDR3 представлены в табл. 1, и связывается с ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА предпочтительно содержит вариательный домен тяжелой цепи (VH), в котором полный набор CDR 1, 2 и 3 (объединенный) имеет более или равную восьмидесяти пяти процентам (85%) идентичность последовательности на аминокислотном уровне с CDR 1, 2 и 3 (объединенный) антител, чьи последовательности CDR представлены в таблице 1, и связывается с ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА предпочтительно содержит вариательный домен тяжелой цепи (VH), в котором полный набор CDR 1, 2 и 3 (объединенный) имеет более или равную восьмидесяти пяти процентам (85%) идентичность последовательности на аминокислотном уровне с CDR 1, 2 и 3 (объединенных) антител, чьи последовательности CDR представлены в таблице 3, и связывается с ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления антитело к ПСМА содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи с по меньшей мере около 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из последовательностей вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 24-58 (показано в табл. 2) и связывается с ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, обладающую специфичностью связывания в отношении ПСМА, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, имеющую специфичность связывания в отношении белка, отличного от ПСМА. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, где каждый из антигенсвязывающих доменов имеет специфичность связывания в отношении ПСМА. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь / легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении первого антигена (например, CD3), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержит Fc-часть, содержащую домены CH2 и/или CH3 и/или CH4, в отсутствие домена CH1. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь / легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белок CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело содержит CD3-связывающий домен VH, который спарен с переменной областью легкой цепи. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой фиксированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 61 в каркасе VH человека. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 64 в каркасе VL человека. Вместе CD3-связывающий домен VH и переменная область легкой цепи имеет аффинность связывания в отношении CD3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность переменной области легкой цепи с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 66.

Полиспецифические антитела, содержащие описанный выше CD3-связывающий домен VH и переменную область легкой цепи, обладают полезными свойствами, например, как описано в опубликованной публикации заявки PCT № WO2018/052503, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Любые из описанных в данном документе полиспецифических антител и антигенсвязывающих доменов, имеющих аффинность связывания в отношении ПСМА, могут быть объединены с CD3-связывающими доменами и фиксированными доменами легкой цепи, описанными в данном документе (см., например, табл. 4 и табл. 5), как а также дополнительные последовательности, такие как представленные в табл. 6 и табл. 7, для создания полиспецифических антител, имеющих аффинность связывания в отношении одной или более эпитопов ПСМА, а также в отношении CD3.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей к CD3

	SEQ aa_CDR1	SEQ aa_CDR2	SEQ aa_CDR3
Тяжелая цепь	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 59)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 60)	AKDSRGGYDYLGGAY (SEQ ID NO: 61)
Легкая цепь	QSVSSN (SEQ ID NO: 62)	GAS (SEQ ID NO: 63)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 64)

Таблица 5

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи к CD3

VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGGYDYLGGAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 65)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 66)

Таблица 6

Последовательности областей Fc человеческих IgG1 и IgG4

IgG1 человека (UniProt № P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 75)
IgG4 человека (UniProt № P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 76)
Человеческий IgG1 с молчащей мутацией (область Fc)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77)
Человеческий IgG4 с молчащей мутацией (область Fc)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTQTYTCNVNHNKPSNTKVDK RVESKYGPPCPSCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 78)

Таблица 7

Дополнительные последовательности

Последовательность в константной области легкой цепи к CD3 (легкая каппа-цепь)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 79)
Последовательность в тяжелой цепи к CD3 (VII + Fc IgG1 ДТ)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGGYDYLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)

Последовательность тяжелой цепи к CD3 (с подвергнутым сайленсингу Fc IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)
Последовательность константной области тяжелой цепи к CD3 (с Fc IgG4 ДТ)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV SCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 82)
Последовательность константной области тяжелой цепи к CD3 (с подвергнутым сайленсингу Fc IgG4)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 83)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир – CH2 – CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 84)
Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир – CH2 – CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 85)
Полноразмерная легкая цепь к CD3 (VL + каппа CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQYNNWPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

<p>Двухвалентная тяжелая цепь к ПСМА (ID клона 346181 x ID клона 345497) + подвергнутый сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSSGGSSISSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGLTVTVSSGGGGGGGGGSSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWDGNSR YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREPRIGYY YESSGYSLDYRGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGGSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 92)</p>
<p>Двухвалентная тяжелая цепь к ПСМА (ID клона 345497 x ID клона 346181) + подвергнутый сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWDGNSRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREPRIGYYESSGYSLDYRGQGLTVTVSSGGGGGGGGGSSQL QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSSGGSSISSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYN CAR HKAATADFDYRGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGGSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 93)</p>

В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, обладающую специфичностью связывания в отношении ПСМА и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, имеющую специфичность связывания в отношении белка, отличного от ПСМА. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая обладает специфичностью связывания в отношении первого антигена, и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего Fc-часть, содержащую CH2 и/или CH3 и/или домены CH4, в отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающего домена, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая имеет специфичность связывания в отношении антигена на эффекторной клетке (например, белок CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего антигенсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении ПСМА.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитело по изобретению представляет собой биспецифическое антитело, одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении ПСМА человека, в то время как другое плечо может быть специфичным в отношении клеток-мишеней, ассоциированных с опухолью антигенов, нацеливающих антигенов, например, интегринов и т.д., антигенов патогенов, белков контрольных точек и т.п. Клетки-мишени, в частности, включают раковые клетки, включая, без ограничения, клетки солидных опухолей, например, опухолей предстательной железы, как обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении ПСМА человека, тогда как другое плечо является специфичным в отношении CD3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи к CD3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 66, связанную с последовательностью SEQ ID NO: 79, полипептид тяжелой цепи к CD3, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, и полипептид тяжелой цепи к ПСМА, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO: 24-58, в одновалентной или двухвалентной конфигурации, связанную с последовательностью любой из SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 84 или 85. Эти последовательности можно комбинировать различными способами для получения биспецифического антитела желаемого подкласса IgG, например, IgG1, IgG4, подвергнутого сайленсингу IgG1, подвергнутого сайленсингу IgG4. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 86, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 87, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 или 93. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой ТСА, состоящую из первого полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 86, второго полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 87, и третьего полипептида, состоящего из SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

В объем изобретения входят различные форматы полиспецифических антител, включая, без ограничения, одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и их кратные им полипептиды. Полиспецифические антитела в данном документе, в частности, включают полиспецифические (например, биспецифические) Т-клеточные антитела, связывающиеся с ПСМА и CD3 (антитела к ПСМА x CD3). Такие антитела вызывают сильное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих ПСМА.

Получение антител к ПСМА.

Антитела по настоящему изобретению можно получить способами, известными в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела продуцируются трансгенными животными, включая трансгенных мышей и крыс, предпочтительно крыс, у которых гены эндогенных иммуноглобулинов нокаутированы или отключены. В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, согласно данному изобретению продуцируются в UniRat™. У UniRat™ гены эндогенного иммуноглобулина подвергнуты сайленсингу, и используется транслокус тяжелой цепи иммуноглобулина человека для экспрессии разнообразного, оптимизированного естественным образом репертуара полностью человеческих HCAb. В то время как эндогенные локусы иммуноглобулина у крыс могут быть нокаутированы или подвергнуты сайленсингу с использованием различных технологий, в UniRat™ для инактивации эндогенного J-локуса тяжелой цепи крысы, локуса Сκ легкой цепи и локуса Сλ легкой цепи была использована технология с использованием (эндо)нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZNF). Конструкции ZNF для микроинъекций в ооциты могут продуцировать нокаутные (KO) по IgH и IgL линии. Подробнее см., например, Geurts et al., 2009, Science 325:433. Characterization of Ig heavy chain knockout rats has been reported by Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Преимущества технологии ZNF заключаются в том, что негомологичное соединение концов для сайленсинга гена или локуса посредством делеций до нескольких т.п.н. также может обеспечивать сайт-мишень для гомологичной интеграции (Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67). Человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые в UniRat™, называются UniAb™ и могут связывать эпитопы, которые нельзя атаковать с помощью обычных антител. Их высокая специфичность, аффинность и небольшой размер делают их идеальными для моно- и полиспецифических применений.

В дополнение к UniAb™, в частности, в данный документ включены антитела, содержащие только тяжелые цепи, лишенные верблюжьего каркаса и мутаций VHH, и их функциональные области VH. Такие антитела, содержащие только тяжелые цепи, могут, например, быть продуцированы у трансгенных крыс или мышей, которые содержат локусы генов, полностью состоящих только из тяжелых цепей человека, как описано, например, в WO2006/008548, но и у других трансгенных млекопитающих, таких как кролик, морская свинка, также можно использовать крыс, причем предпочтительны крысы и мыши. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, включая их функциональные фрагменты VHH или VH, также могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК путем экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в подходящем эукариотическом или прокариотическом хозяине, включая, например, клетки млекопитающих (например, клетки CHO), E. coli или дрожжи.

Домены антител, содержащих только тяжелые цепи, сочетают в себе преимущества антител и низкомолекулярные лекарственные средства: могут быть одновалентными или многовалентными; обладают низкой токсичностью; и экономически эффективны в производстве. Из-за их небольшого размера эти домены просты в применении, включая пероральное или местное введение, характеризуются высокой стабильностью, включая стабильность в желудочно-кишечном тракте; и их период полужизни может быть адаптирован к желаемому применению или показаниям. Кроме того, домены VH и VHH HCAb могут быть получены экономически эффективным способом.

В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, согласно данному изобретению, включая UniAb™, имеют нативный аминокислотный остаток в первом положении области FR4 (аминокислотное положение 101 согласно системе нумерации Kabat), замещенный другим аминокислотным остатком, который способен разрушать экспонированный на поверхности гидрофобный участок, содержащий или связанный с нативным аминокислотным остатком в этом положении. Такие гидрофобные участки, как правило, скрыты на поверхности взаимодействия с константной областью легкой цепи антитела, но становятся доступными на поверхности в HCAb и, по меньшей мере частично, служат для нежелательной агрегации и ассоциации легкой цепи HCAb. Замещенный аминокислотный остаток предпочтительно является заряженным и более предпочтительно положительно заряженным, например, лизином (Lys, K), аргинином (Arg, R) или гистидином (His, H), предпочтительно аргинином (R). В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, полученные от трансгенных животных, содержат мутацию Trp в Arg в положении 101. Получаемые в результате HCAb предпочтительно обладают высокой аффинностью связывания с антигеном и растворимостью в физиологических условиях в отсутствие агрегации.

В рамках настоящего изобретения были идентифицированы человеческие антитела IgG, содержащие только тяжелые цепи, к ПСМА с уникальными последовательностями от животных UniRat™ (UniAb™), которые связываются с ПСМА человека в анализах белков и связывания клеток на основе ИФА. Идентифицированные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) положительны в отношении связывания белка ПСМА человека и/или связывания с ПСМА+ клетками, и все они отрицательны в отношении связывания с клетками, которые не экспрессируют ПСМА; см., например, табл. 8.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами на белке ПСМА, например, UniAb™, можно идентифицировать с помощью анализов конкурентно-

го связывания, таких как иммуноферментные анализы (ИФА) или анализы конкурентного связывания на основе проточной цитометрии. Например, можно использовать конкуренцию между известными антителами, связывающимися с антигеном-мишенью, и представляющим интерес антителом. Используя этот подход, можно разделить набор антител на те, которые конкурируют с эталонным антителом, и те, которые не конкурируют. Неконкурирующие антитела идентифицируются как связывающиеся с отдельным эпитопом, который не перекрывается с эпитопом, связанным эталонным антителом. Часто одно антитело иммобилизуют, антиген связывается, а второе, меченое (например, биотинилированное) антитело тестируют в анализе на основе ИФА на способность связывать захваченный антиген. Это также можно сделать с помощью платформ для поверхностного плазмонного резонанса (ППР), включая ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 и Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) и системе визуализации для ППР MX96 (Ibis technologies BV), а также на других платформах для биослойной интерферометрии, таких как Octet Red384 и Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Для получения дополнительных сведений см. Примеры в данном документе.

Как правило, антитело "конкурирует" с эталонным антителом, если оно вызывает примерно 15-100% снижение связывания эталонного антитела с антигеном-мишенью, как определено стандартными методами, например, с помощью анализов конкурентного связывания, описанных выше. В различных вариантах осуществления относительное ингибирование составляет по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или выше.

Фармацевтические композиции, применение и способы лечения

Другим аспектом данного изобретения является предложение фармацевтических композиций, содержащих одно или более антител по настоящему изобретению в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в данном документе, например, но не ограничиваются ими, адьюванты, твердые носители, вода, буферы или другие носители, используемые в данной области для хранения терапевтических компонентов или их комбинаций.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAbTM), которое связывается с ПСМА. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое) антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAbTM) со специфичностью связывания в отношении двух или более неперекрывающихся эпитопов на белке ПСМА. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое и ТСА) антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAbTM) со специфичностью связывания с ПСМА и со специфичностью связывания с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью связывания на Т-клетке, такой как, например, белок CD3 на Т-клетке).

Фармацевтические композиции антител, используемые в соответствии с настоящим изобретением, получают для хранения путем смешивания белков, имеющих желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), например, в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно стерильны и по существу изотоничны и произведены согласно условиям правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (например, дозировка для единичного введения). Состав зависит от выбранного пути введения. Антитела описанные в данном документе могут вводиться посредством внутривенной инъекции или инфузии, или подкожно. Для инъекционного введения, антитела описанные в данном документе могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически-совместимых буферах

для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы как описано выше. В качестве альтернативы, антитела могут быть лиофилизированы для смешивания с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед использованием.

Составы антител описаны, например, в патенте США № 9034324. Подобные составы могут быть использованы для антител, содержащих только тяжелые цепи, включая UniAb™, по данному изобретению. Составы антител для подкожного введения описаны, например, в патентах US20160355591 и US20160166689.

Способы применения.

Антитела к ПСМА и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний и патологических состояний, характеризующихся экспрессией ПСМА, включая, без ограничения, патологические состояния и заболевания, описанные далее в данном документе.

ПСМА представляет собой трансмембранный белок типа II, который экспрессируется в ткани эпителия предстательной железы и его экспрессия усиливается в злокачественном новообразовании предстательной железы и в новой сосудистой сети солидных опухолей. Он также экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях, таких как мозг, почки и слюнные железы, но его избыточная экспрессия в злокачественной ткани предстательной железы делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения злокачественного новообразования предстательной железы. Он также может быть актуален для терапии или визуализации солидных опухолей, учитывая его высокую экспрессию в злокачественных новообразованных сосудах. Моноклональные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство и Т-клетки с химерным антигенным рецептором, нацеленные на ПСМА, были описаны для лечения метастатического злокачественного новообразования предстательной железы (Hernandez-Hoyos et al., 2016, PMID: 27406985, DiPippo et al., 2014, PMID: 25327986, Serganova et al., 2016, PMID: 28345023). Кроме того, радионуклидные конъюгаты, специфичные для ПСМА, исследуют в отношении визуализации и лечения злокачественного новообразования предстательной железы (например, Hofman et al., 2018 PMID: 29752180).

В одном аспекте указанные в данном документе антитела к ПСМА (например, UniAb™) и фармацевтические композиции могут быть использованы для лечения расстройств, характеризующихся экспрессией ПСМА, включая, без ограничения, злокачественное новообразование предстательной железы и солидные опухоли.

Эффективные дозы композиций согласно данному изобретению для лечения заболевания варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, место назначения, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но млекопитающие, отличные от человека, также могут поддаваться лечению, например, домашние животные, такие как собаки, кошки, лошади и т.д., лабораторные млекопитающие, такие как кролики, мыши, крысы и т.д., и тому подобное. Для оптимизации безопасности и эффективности можно подбирать лекарственные дозировки.

Уровни дозировки могут быть легко определены обычным квалифицированным врачом и могут быть изменены при необходимости, например, при необходимости изменения реакции субъекта на терапию. Количество действующего вещества, которое можно комбинировать с материалами носителя для получения единичной лекарственной формы, варьируется в зависимости от хозяина, который поддается лечению, и конкретного способа введения. Стандартные лекарственные формы обычно содержат от около 1 мг до около 500 мг действующего вещества.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая дозировка агента может составлять от около 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг от массы тела хозяина. Например, дозировка может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Иллюстративный режим лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые 3-6 месяцев. Терапевтические вещества по настоящему изобретению обычно вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня терапевтического вещества в крови пациента. Альтернативно, терапевтические вещества по настоящему изобретению можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни полипептида у пациента.

Как правило, композиции готовят в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов, либо суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Фармацевтические композиции описанные в данном документе подходят для внутривенного или подкожного введения, непосредственно или после восстановления из твердой (т.е., лиофилизованной) композиции. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополи-

мер, для усиления адьювантного эффекта, как описано выше. Langer, *Science* 249: 1527, 1990 и Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119, 1997. Агенты согласно данному изобретению можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить длительное или пульсирующее высвобождение действующего вещества. Фармацевтические композиции, как правило, составлены как стерильные, практически изотонические и полностью соответствующие всем нормам Правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

Токсичность антител и структур антител, описанных в данном документе, может быть определена стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, путем определения LD50 (доза, летальная для 50% популяции) или LD100 (доза, летальная для 100% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектом является терапевтическим показателем. Данные, полученные из этих анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при составлении диапазона доз, который не токсичен для применения у людей. Дозировка антител, описанных в данном документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают эффективную дозу с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах данного диапазона в зависимости от используемой дозы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбраны индивидуально врачом с учетом состояния пациента.

Композиции для введения обычно содержат антитело или другой абляционный агент, растворенный в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно в водном носителе. Могут быть использованы различные водные носители, например, забуференный солевой раствор и тому подобное. Данные растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты и тому подобное, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобное. Концентрация активного агента в данных составах может варьироваться в широких пределах и будет выбираться в основном на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и тому подобного в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента (например, Remington's *Pharmaceutical Science* (15th ed., 1980) и Goodman & Gillman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman et al, eds., 1996)).

Также в объем изобретения входят наборы, содержащие активные агенты и их составы, изобретения и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный компонент, например, химиотерапевтический препарат и др. Наборы, как правило, включают этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Используемый в данном документе термин "этикетка" включает любые письменные или записанные материалы, поставляемые в наборе или вместе с ним, или иным образом сопровождающие набор.

Теперь, когда изобретение полностью описано, для специалиста в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от сущности или объема изобретения.

Примеры

Материалы и способы.

Пример 1. Иммунизация UniRat™ рекомбинантным человеческим ПСМА.

Двенадцать животных UniRat™ иммунизировали рекомбинантным человеческим белком ПСМА, слитым с His-меткой (R&D Systems, кат. №: 4234-ZN). Животных иммунизировали дважды в неделю в течение восьми недель. После 35-дневного курса иммунизации у крыс собирали сыворотку для определения титров в сыворотке.

Результаты для титров в сыворотке.

Сводная информация о титрах в сыворотке приведена на фиг. 1, панелях А-В. На графиках, изображенных на фиг. 1, панелях А-В, каждая линия представляет отдельное животное. На легендах графиков показан идентификационный номер каждого отдельного животного. Связывающую активность для серии разведений сыворотки по 12 точкам тестировали с помощью ИФА против белка ПСМА человека с His-меткой и нецелевого белка с His-меткой. Среди этой группы животных наблюдали ряд уровней реактивности сыворотки с белком ПСМА человека. Не наблюдали сывороточного ответа на нецелевой белок с His-меткой.

Пример 2. Анализ методом проточной цитометрии связывания с положительными и отрицательными по ПСМА клетками UniAb™ к ПСМА.

Связывание с ПСМА-положительными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore) с использованием линии клеток LNCaP (ATCC: CRL-1740), линии клеток 22Rv1 (ATCC CRL-2505), линии клеток PC3 (ATCC CRL-1435), стабильно трансфицированной для экспрессии ПСМА человека, или линии клеток DU-145 (ATCC HTB-81). Вкратце, 50000 клеток-

мишеней окрашивали серией разведений очищенного UniAb™ в течение 30 минут при 4°C. После инкубации клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии (1X PBS, 1 % БСА, 0,1 % NaN₃) и окрашивали козьим F(ab')₂ антителом к человеческому IgG, конъюгированным с R-фикоэритрином (PE) (Southern Biotech, кат. № 2042-09) для обнаружения связанных с клетками антител. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии и измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) с помощью проточной цитометрии. СИФ клеток, окрашенных только вторичным антителом, использовали для определения фонового сигнала, а связывание каждого антитела преобразовывали в значение кратности превышения фонового сигнала. Связывание с положительными по ПСМА яванского макака определяли с использованием того же протокола со следующими модификациями: клетки-мишени были получены из клеток Freestyle 293-F (ThermoFisher R79007), транзientно трансфицированных для экспрессии внеклеточного домена ПСМА яванского макака. В некоторых экспериментах значения EC50 рассчитывали с помощью GraphPad Prism 7.

В табл. 8 приведена активность связывания с мишенью нескольких антител, содержащих только тяжелые цепи, к ПСМА (HCAb), описанных в данном документе. В столбце 1 показан ID клона HCAb. В столбце 2 показано связывание с клетками LNCaP, измеренное в виде кратности превышения фонового сигнала СИФ.

Таблица 8
Связывание с линией клеток, экспрессирующих ПСМА

Столбец 1: ID КЛОНА	Столбец 2: LNCaP
325920	282
346181	264
346165	243
346172	216
326109	25
325867	210
325742	200
325748	193
325940	169
325836	163
326027	138
326087	129
326084	125
326028	117
345497	112
326029	109
345461	102
345493	101
345436	87
345443	84
345490	80
345482	80
345485	71
345463	68
325932	64
345505	59
345508	55
345480	47
326116	38
345509	37
345444	23
345421	22
345447	14
345510	13
345438	13

Различия в связывании с ПСМА яванского макака, как показано на фиг. 2, панели А и В, подтверждает различие в эпитопе ПСМА человека, распознаваемом HCAb 346181 и 345497.

Пример 3. Связывание рекомбинантных белков с помощью биослойной интерферометрии (BLI).

Используя биослойную интерферометрию, оценивали конкуренцию за связывание между двумя семействами антител, членами которых являются клон ID 345497 и клон ID 346181. Анализ методом эпитоп-специфической сортировки антиген-антитело выполняли на Octet QK-384 (ForteBio). Вкратце, сенсоры для захвата пентагистидиновой последовательности (HIS1K) ("Пента-HIS", описанные как SEQ ID NO: 95) использовали для иммобилизации антигена - рекомбинантного человеческого ПСМА (R&D Systems, кат. №: 4234-ZN) в течение 120 секунд. После определения базового уровня сенсоры погружали в растворы, содержащие антитело 1 (325867), на 300 с, а другой базовый уровень устанавливали в течение

60 секунд. Затем сенсоры погружали в лунки, содержащие либо антитело 1 в качестве положительного контроля для блокирования, либо антитело 2 (325920). Скорости ассоциации и диссоциации измеряли в течение 300 и 600 секунд, соответственно. Анализ данных выполняли с помощью Octet Data Analysis HT v11.0 (ForteBio). Как показано на фиг. 3, 325920 связывает белок ПСМА, предварительно связанный с антителом 325867, что свидетельствует о том, что эти два антитела распознают неперекрывающиеся эпитопы на ПСМА. Сдвиг сигнала связывания выражается в нанометрах.

Пример 4. Композиция бипаратопных и двухвалентных антител к ПСМА.

Как показано в табл. 9, клон ID 350123 состоит из последовательности клона ID 346181, связанной с последовательностью клона ID 345497 через мостиковую последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74). Клон ID 350122 состоит из двух повторов клона ID 346181, соединенных одной и той же линкерной последовательностью. Клон ID 350123 является бипаратопным, поскольку он состоит из двух доменов к ПСМА, распознающих разные эпитопы на ПСМА. Клон ID 350122 является двухвалентным, но не бипаратопным, поскольку он состоит из одного и того же домена к ПСМА в тандеме. Схематические иллюстрации различных антител к ПСМА x CD3 показаны на фиг. 5, панели А-С.

Таблица 9

Описание аминокислотной последовательности бипаратопных и двухвалентных антител к ПСМА

ID клона	Последовательность 1	Линкерная последовательность	Последовательность 2
350123	346181	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74)	345497
350122	346181	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 74)	346181

Пример 5. Определение аффинности к ПСМА человека, экспрессируемому на клеточной поверхности.

Аффинность к ПСМА клеточной поверхности определяли при помощи анализа Скэтчарда с использованием линии клеток карциномы предстательной железы человека 22Rv1. Сначала полиспецифические антитела к ПСМА x CD3 были помечены Alexa Fluor 488 с использованием набора Alexa Fluor 488 5-SDP Ester (ThermoFisher A30052). Связывание с 22Rv1 затем оценивали с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore). Вкратце, 100000 клеток-мишеней окрашивали серией разведений полиспецифических антител, меченных Alexa Fluor 488, в течение 1 ч при 4°C. После инкубации клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии и измеряли среднюю интенсивность флуоресценции с помощью проточной цитометрии.

Чтобы получить стандартную кривую для расчета молекул эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF), совокупности шариков с MESF от Bangs Lab Quantum Alex Fluor 488 с 1 по 4 объединяли в одной пробирке и запускали на Guava easyCyte 8HT. Пустые шарики анализировали в отдельной пробирке. СИФ каждой совокупности шариков измеряли в FITC-канале. Линейная регрессия Log10 (СИФ) против Log10 (MESF) была построена с использованием GraphPad Prism 7.

СИФ каждого экспериментального образца интерполировали на калибровочную кривую, и MESF определяли для каждого образца. Затем рассчитывали среднее количество антител, связанных на клетку (ABC), путем деления среднего MESF на степень мечения (DOL) антитела. Число ABC умножали на концентрацию клеток, чтобы определить общую концентрацию связанного антитела. Концентрацию свободных антител рассчитывали путем вычитания концентрации связанных антител из окрашивающей концентрации (начальная доза). Концентрация свободных антител была построена против концентрации связанных антител в GraphPad Prism 7. Полученный график был аппроксимирован к нелинейной регрессии, функции связывания, специфичной для одного сайта, для определения аффинности, как показано на фиг. 4, панели А и В.

Пример 6. Опосредованное полиспецифическим антителом уничтожение ПСМА-положительных клеток опухоли предстательной железы посредством перенаправления Т-клеток.

Анализы с использованием покоящихся Т-клеток.

Клетки-мишени высеивали из расчета 15000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение ночи при 37°C. После инкубации увеличивающиеся количества полиспецифического антитела добавляли вместе с покоящимися Т-клетками человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1 и инкубировали в течение дополнительных 48 или 72 ч при 37°C (48 ч для анализов с клетками LNCaP, MDA-PCa-2b и PC3-PSMA и 72 часа для анализов с клетками 22Rv1). Гибель клеток измеряли с использованием реагента для пролиферации клеток WST-1 (Sigma кат. №: 11644807001) или при помощи проточной цитометрии. В некоторых экспериментах небольшой образец каждого супернатанта собирали после инкубации, но до анализа жизнеспособности клеток-мишеней, и сохраняли для анализа продукции цитокинов. Когда жизнеспособность клеток анализировали с помощью реагента WST-1, исходный реагент добавляли в каждую лунку в разведении 1:10 и инкубировали в течение 90 мин при 37°C. Затем измеряли оптическую плотность при 450 нм (эталонная длина волны 690 нм) и рассчитывали процент специфического лизиса.

Если жизнеспособность клеток-мишеней анализировали с помощью проточной цитометрии, то клетки-мишени метили перед началом анализа мембранным красителем DiR (ThermoFisher D12731). После инкубации с Т-клетками и антителами супернатанты либо сохраняли для анализа цитокинов, либо

утилизировали. Затем лунки промывали один раз для сбора мертвых клеток опухоли и Т-клеток, которые переносили в планшет для проточной цитометрии. Оставшиеся прикрепленные клетки опухоли обрабатывали трипсином и затем добавляли в соответствующие лунки планшета для проточной цитометрии. Реагент аннексин-V использовали для окрашивания мертвых клеток, и проводили проточную цитометрию (BD FACSCelesta) для количественного определения процента мертвых опухолевых клеток в каждом образце, гейтируемых по окрашиванию DiR. Лунки, содержащие необработанные клетки-мишени, использовали для нормализации спонтанной гибели клеток. В некоторых экспериментах использовали антитело отрицательного контроля, состоящее из того же нацеленного на CD3 плеча, что и в полиспецифических молекулах к ПСМА x CD3, но заменой нацеленного на опухоль плеча на VH, специфичную к белку gp120 ВИЧ.

На фиг. 7 показан опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток с использованием нестимулированных Т-клеток. Нестимулированные человеческие Т-клетки инкубировали с клетками, экспрессирующими ПСМА (LNCaP), и различными концентрациями полиспецифических антител. Бипаратопное антитело к ПСМА x CD3 (350123xCD3) превзошло монопаратопное антитело к ПСМА x CD3 (346181xCD3).

Анализы с использованием предварительно активированных Т-клеток.

Пан-Т-клетки человека предварительно активировали связанными с планшетом ОКТ3 и ИЛ-2 в течение трех дней с последующим дополнительным днем инкубации со свежим ИЛ-2. Клетки-мишени трипсинизировали, нагружали кальцеином-AM (ThermoFisher C3100MP), смешивали с активированными Т-клетками до соотношения Е:Т 20:1 и добавляли в лунки 96-луночного планшета. Добавляли серии разведений различных полиспецифических антител с последующей инкубацией в течение 4 ч при 37°C. Затем супернатанты переносили в черные 96-луночные планшеты и измеряли оптическую плотность при 480 нм / 520 нм возбуждения/испускания для количественного определения высвобождения кальцеина. Клетки-мишени, инкубированные без Т-клеток, использовали для нормализации спонтанного высвобождения кальцеина интактными клетками опухоли. Добавление 2% Тритона-Х в контрольные лунки, содержащие клетки-мишени, позволило рассчитать сигнал кальцеина, соответствующий максимальному лизису клеток. Используя это значение, каждая экспериментальная лунка была представлена в виде процента максимального лизиса клеток. Анализ данных проводили с использованием GraphPad Prism 7.

На фиг. 6 показан опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток с использованием предварительно активированных Т-клеток. Предварительно активированные Т-клетки человека инкубировали с клетками, экспрессирующими ПСМА человека, (LNCaP) и различными концентрациями полиспецифических антител. Гибель опухолевых клеток измеряли по высвобождению кальцеина и нормализовали по спонтанному высвобождению опухолевых клеток в отсутствие Т-клеток. Бипаратопное антитело к ПСМА x CD3 (350123xCD3) превзошло оба монопаратопных антитела к ПСМА x CD3.

На фиг. 8 показано, что полиспецифические антитела не лизируют ПСМА-отрицательные клетки. Предварительно активированные человеческие Т-клетки инкубировали с ПСМА-отрицательными клетками злокачественного новообразования предстательной железы (DU145) и различными концентрациями полиспецифических антител. Ни одно из протестируемых антител не привело к лизису этих клеток.

На фиг. 9 показано связывание полиспецифических антител к ПСМА x CD3 с положительными и отрицательными по ПСМА клетками. Полиспецифические антитела к ПСМА x CD3 демонстрируют связывание с ПСМА-положительными клетками опухоли предстательной железы (22Rv1), но не связываются с ПСМА-отрицательными клетками опухоли предстательной железы (DU145). Бипаратопная молекула (350123) показала самое сильное связывание с клеткой-мишенью.

На фиг. 10 показан опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток. Данные на фиг. 10 демонстрирует, что связывание с ПСМА через два разных эпитопа приводит к увеличению гибели клеток по сравнению с двухвалентной, но моноспецифической версией антитела.

Пример 7. Монопаратопное биспецифическое антитело к ПСМА x CD3 индуцирует меньшую продукцию цитокинов, чем бипаратопное полиспецифическое антитело к ПСМА x CD3

Производство цитокинов анализировали в анализах цитотоксичности опухоли с покоящимися Т-клетками. Дизайн этих анализов подробно описан в другом месте данного документа. Супернатанты собирали после завершения анализов (после 72 часов инкубации для анализов с использованием клеток 22Rv1, 48 часов для всех других линий клеток). Наборы для ИФА использовали для обнаружения ИЛ-2 (Biolegend 431804) и ИФН-γ (Biolegend 430104) в соответствии с протоколом производителя. Экспериментальные супернатанты разбавляли перед анализом на основе ИФА так, чтобы уровни цитокинов попадали в линейную часть стандартной кривой, поставляемой с каждым набором. В некоторых случаях цитокины не могли быть обнаружены в экспериментальных лунках, и значения были указаны как меньшие или равные нижнему пределу количественного определения для анализа.

На фиг. 12, панели А-С, показан опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток и сравнение с продукцией цитокинов. Полиспецифические антитела к ПСМА x CD3 индуцируют опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительной линии клеток злокачественного новообразования предстательной железы LNCaP. Бипаратопная молекула (350123) стимулировала более сильное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с монопаратопной молекулой (346181), но также вызывала вы-

работку более высоких уровней цитокинов, гамма-интерферона (ИФН- γ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2), как показано на фиг. 12, панели В и панели С.

В табл. 10 показан опосредованный Т-клетками лизис и продукция цитокинов против четырех линий РСМА-положительных клеток опухоли предстательной железы. Полиспецифические антитела к РСМА х CD3 тестировали в анализах цитотоксичности опухолевых клеток *in vitro* с использованием нестимулированных Т-клеток и серии доз антитела против панели из четырех линий РСМА-положительных клеток опухоли. Через 72 часа (22Rv1) или 48 часов (MDA-PCa-2b, LNCAP, PC3-PSMA) рассчитывали процент гибели клеток опухоли и регистрировали с помощью ЕС50, а также если достигали наивысшего процента уничтожения. Супернатанты из этих экспериментальных лунок собирали и анализировали с помощью ИФА на цитокины, гамма-интерферон (ИФН- γ) или интерлейкин-2 (ИЛ-2). Монопаратопная молекула (3461881) индуцировала приблизительно эквивалентные уровни противоопухолевой цитотоксичности в отношении всех четырех тестируемых линий клеток по сравнению с бипаратопной молекулой, но имела более высокие ЕС50 в отношении продукции цитокинов и в большинстве случаев стимулировала более низкие уровни максимальной продукции цитокинов.

Таблица 10

Т-клеточный лизис и продукция цитокинов против четырех линий РСМА-положительных клеток опухоли предстательной железы

Линия клеток	Анти-тело	Связыва-ние клеток, ЕС50 (нМ)	Максимальная цитотоксичность (% лизиса)	Уничтожение, ЕС50 (нМ)	Макс. ИФН- γ (нг/мл)	ИФН- γ , ЕС50 (нМ)	Макс. ИЛ-2 (нг/мл)	ИЛ-2, ЕС50 (нМ)
22Rv1	346181x CD3	58	45	52,8	21 150	173,8	≤НПКО	Н/Д
	350123x CD3	3	53	0,42	73 031	380,2	≤НПКО	Н/Д
MDA-PCa-2b	346181x CD3	28	26	23,6	14 309	116,5	524	38,5
	350123x CD3	2	29	0,41	12 026	0,90	1111	1,11
LNCAP	346181x CD3	17	79	14,6	32 237	63,0	183	575
	350123x CD3	2	75	0,84	60 397	3,29	1057	3,73
PC3-PSMA	346181x CD3	30	42	3,7	7 340	10,1	1569	4,1
	350123x CD3	6	51	0,40	10 136	1,01	3480	1,1

Пример 8. Полиспецифические антитела к РСМА х CD3 индуцируют пролиферацию Т-клеток.

РСМА-положительные клетки опухоли высевали из расчета 25000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение ночи при 37°C. Пан-Т-клетки человека, выделенные из покоящихся МКПК (Miltenyi 130-096-535), метили красителем CFSE для отслеживания линии дифференцировки в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher C34554). Затем в лунки, содержащие клетки опухоли, добавляли 100000 меченых пан-Т-клеток с последующей серией разведений антител и инкубировали при 37°C, 8% CO₂. После 5 дней инкубации клетки осторожно перемешивали и переносили в планшет для проточной цитометрии. Клетки осаждали и супернатант удаляли с последующим окрашиванием анти-CD8, конъюгированным с APC, (Biolegend 301049), и анти-CD4, конъюгированным с PE, (Biolegend 317410), в течение 20 мин на льду. Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии для анализа (BD FACSCelesta). Клетки гейтировали по прямому и боковому рассеянию, а также по экспрессии CD4 или CD8. Процент Т-клеток, которые пролиферировали, на что указывает положительное окрашивание CD4 или CD8 и низкий или отрицательный сигнал CFSE, рассчитывали для всей популяции Т-клеток, а также для субпопуляций CD4 и CD8. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью FlowJo и наносили на график в GraphPad Prism 7.

На фиг. 11, панели А-Д, показано, что полиспецифические антитела к РСМА х CD3 стимулировали пролиферацию Т-клеток в присутствии РСМА-положительных клеток опухоли, и что монопаратопные биспецифические антитела к РСМА предпочтительно активируют CD3 Т-клетки. Полиспецифические антитела инкубировали вместе с клетками опухоли, экспрессирующими РСМА, и Т-клетками, меченными красителем CFSE для отслеживания линии дифференцировки. После 5 дней инкубации пролиферацию Т-клеток и состав пролиферированных Т-клеток (CD8+ и CD4+) анализировали с помощью проточной цитометрии. На панелях А и В показана общая пролиферация Т-клеток, тогда как на панелях С и Д показано соотношение CD8+ и CD4+ Т-клеток в лунках с пролиферацией. Пунктирная горизонтальная линия демонстрирует соотношение CD8: CD4 нестимулированных Т-клеток и составляет приблизительно 1:2 (фактическое значение = 0,64). Монопаратопное биспецифическое антитело к РСМА х CD3 (346181) предпочтительно активирует CD8 Т-клетки (соотношение CD8:CD4 после экспансии около 2:1), тогда как бипаратопное полиспецифическое антитело к РСМА х CD3 (350123) в меньшей степени активирует CD8+ Т-клетки (соотношение CD8:CD4 составляет около 1:1).

Пример 9. Полиспецифическое антитело вызывает подавление роста опухоли предстательной железы в модели ксенотрансплантата.

Самцам мышей CIEA-NOG с иммунодефицитом в возрасте 5-6 недель (Taconic) имплантировали 10 миллионов клеток 22Rv1 подкожно в их нижнюю часть правого бока с последующим добавлением 10 миллионов МКПК человека посредством инъекции в хвостовую вену через один день после имплантации опухоли. Животные получали лечение 100 мкг полиспецифического антитела или носителя путем инъекции в хвостовую вену, начиная через один день после имплантации опухоли на 1, 5, 9 и 13 дни. Объем опухоли определяли с помощью штангенциркуля и регистрировали в течение 25 дней.

На фиг. 13 показаны результаты модели ксенотрансплантата опухоли 22Rv1.

Бипаратопная молекула к ПСМА х CD3 (350123) продемонстрировала ингибирование роста опухоли 22Rv1 в модели ксенотрансплантата опухоли. Для каждой группы лечения тестировали трех мышей, и изменение объема опухоли для каждого животного наносили на график в миллиметрах. Животные получали МКПК на 1 день после имплантации опухоли и получали лечение антителами на 1, 5, 9 и 13 дни. У двух из трех животных, получавших полиспецифические антитела, отмечалось замедление прогрессирования опухоли.

Несмотря на то что в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения и, что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула, которая связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащая:

(a) первую полипептидную субъединицу, включающую CD3-связывающий домен вариабельной области тяжелой цепи (VH);

(b) вторую полипептидную субъединицу, содержащую вариабельный домен легкой цепи, где CD3-связывающий домен VH первой полипептидной субъединицы спарен с указанным вариабельным доменом легкой цепи второй полипептидной субъединицы; и

(c) третью полипептидную субъединицу, содержащую вариабельную область тяжелой цепи анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, где вариабельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит:

i) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 11 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 18; или

ii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 12 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 18; или

iii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 11 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 18; или

iv) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 13 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 18; или

v) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 19; или

vi) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или

vii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 21; или

viii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 16 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 21; или

ix) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 19; или

x) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или

xi) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или

xii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 22; или

xiii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или

- xiv) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или
- xv) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 21; или
- xvi) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 14 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или
- xvii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или
- xviii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 16 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 21; или
- xix) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 16 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 23; или
- xx) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 8, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или
- xxi) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20; или
- xxii) CDR1 последовательности SEQ ID NO: 10, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 15 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20.

2. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1, в которой последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы присутствуют в человеческом каркасе.

3. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, где варибельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит:

(a) последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 18; или

(b) последовательность CDR1 с SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 с SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 с SEQ ID NO: 20.

4. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, где последовательность варибельной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 24-58.

5. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, где последовательность варибельной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24-58.

6. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.5, где последовательность варибельной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы представляет собой SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 38.

7. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, в которой варибельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH.

8. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, в которой варибельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

9. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, в которой варибельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH.

10. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.1 или 2, в которой варибельная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

11. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула, которая связывает белок ПСМА и белок CD3, содержащая:

(a) первую полипептидную субъединицу, включающую CD3-связывающий домен варибельной области тяжелой цепи (VH);

(b) вторую полипептидную субъединицу, содержащую варибельный домен легкой цепи, где CD3-связывающий домен VH первой полипептидной субъединицы спарен с указанным варибельным доменом легкой цепи второй полипептидной субъединицы; и

(с) третью полипептидную субъединицу, содержащую первую переменную область тяжелой цепи анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, и вторую переменную область тяжелой цепи анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, где:

i) первая переменная область тяжелой цепи содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH; а

ii) вторая переменная область тяжелой цепи содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH.

12. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.11, в которой первая переменная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы расположена ближе к N-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы.

13. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.11, в которой первая переменная область тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы расположена ближе к C-концу относительно второй переменной области тяжелой цепи третьей полипептидной субъединицы.

14. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что:

CD3-связывающий домен VH первой полипептидной субъединицы содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 65; и

вариабельный домен легкой цепи второй полипептидной субъединицы содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 66.

15. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что

CD3-связывающий домен VH первой полипептидной субъединицы содержит последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 65; и

вариабельный домен легкой цепи второй полипептидной субъединицы содержит вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 66.

16. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула, которая связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащая

первую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 87;

вторую полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 86; и

третью полипептидную субъединицу, содержащую последовательность SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

17. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по п.16, где третья полипептидная субъединица содержит последовательность SEQ ID NO: 88.

18. Биспецифическое антитело, которое связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащее:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аффинность связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 61 в каркасе человеческой VH;

(ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 64 в каркасе VL человека; и

(iii) антигенсвязывающий домен анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащий последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH.

19. Биспецифическое антитело, которое связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащее:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аффинность связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 61 в каркасе человеческой VH;

(ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 64 в каркасе человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащий последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

20. Биспецифическое антитело, которое связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащее:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аффинность связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 61 в каркасе человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 64 в каркасе человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащий последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH.

21. Биспецифическое антитело, которое связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аффинность связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 61 в каркасе человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 64 в каркасе человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащий последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH в одновалентной или двухвалентной конфигурации.

22. Полиспецифическое антитело, которое связывается с белком ПСМА и белком CD3, содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аффинность связывания с CD3, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 59, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 60 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 61 в каркасе человеческой VH;

(ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 62, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 63 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 64 в каркасе человеческой VL; и

(iii) антигенсвязывающий домен анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, при этом антигенсвязывающий домен содержит первую и вторую антигенсвязывающие области в двухвалентной конфигурации, где

первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 в каркасе человеческой VH; а

вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе человеческой VH.

23. Полиспецифическое антитело по п.22, в котором первая антигенсвязывающая область расположена ближе к N-концу относительно второй антигенсвязывающей области.

24. Полиспецифическое антитело по п.22, в котором первая антигенсвязывающая область расположена ближе к C-концу относительно второй антигенсвязывающей области.

25. Полиспецифическое антитело по любому из пп.22-24, в котором первая и вторая антигенсвязывающие области антигенсвязывающего домена анти-ПСМА антитела, содержащего только тяжелые цепи, соединены полипептидным линкером.

26. Полиспецифическое антитело по п.25, в котором полипептидный линкер представляет собой GS-линкер.

27. Полиспецифическое антитело по п.26, в котором GS-линкер состоит из последовательности SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу по любому из пп.1-17, или полиспецифическое антитело по любому из пп.22-27, или биспецифическое антитело по любому из пп.18-21.

29. Способ лечения расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА, включающий введение субъекту с указанным расстройством полиспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу по любому из пп.1-17, или полиспецифическое антитело по любому из пп.22-27, или биспецифическое антитело по любому из пп.18-21, или фармацевтической композиции по п.28.

30. Способ по п.29, где расстройство представляет собой злокачественное новообразование предстательной железы.

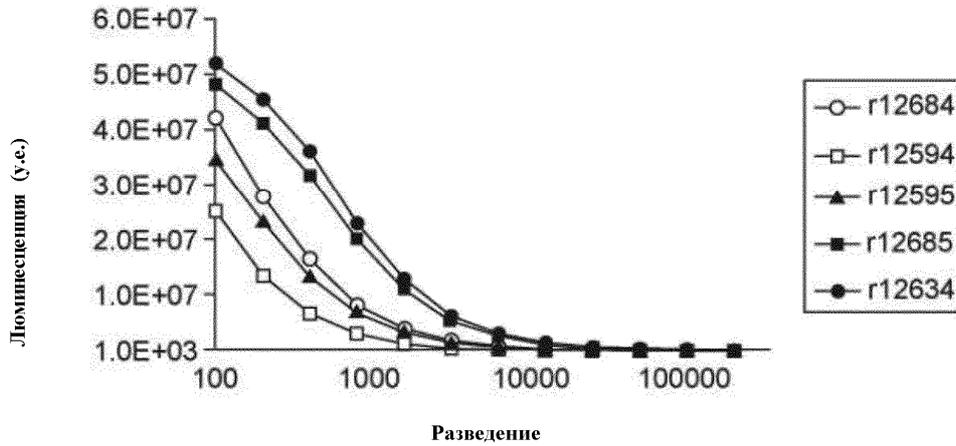
31. Применение полиспецифической трехцепочечной антителоподобной молекулы по любому из пп.1-17, или полиспецифического антитела по любому из пп.22-27, или биспецифического антитела по любому из пп.18-21 в изготовлении лекарственного препарата для лечения расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА.

32. Применение по п.31, где расстройство представляет собой злокачественное новообразование предстательной железы.

33. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула по любому из пп.1-17, или полиспецифическое антитело по любому из пп.22-27, или биспецифическое антитело по любому из пп.18-21 для лечения расстройства, характеризующегося экспрессией ПСМА.

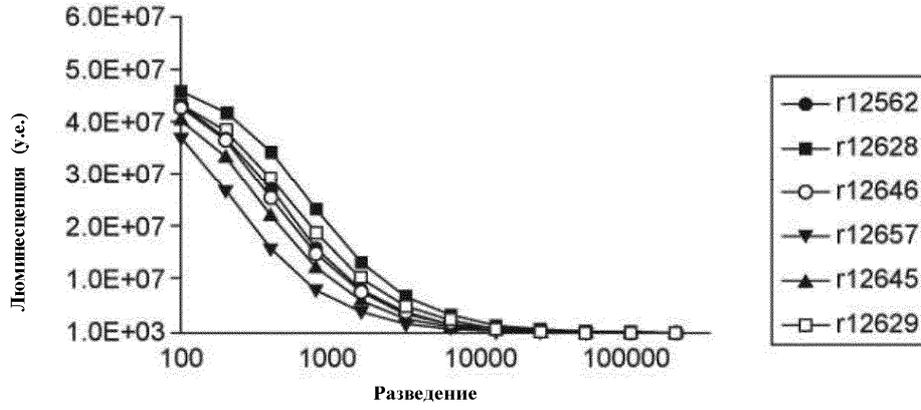
34. Полиспецифическая трехцепочечная антителоподобная молекула, или полиспецифическое антитело, или биспецифическое антитело по п.33, где расстройство представляет собой злокачественное новообразование предстательной железы.

Сывороточные титры - ПСМА, CFA/IFA



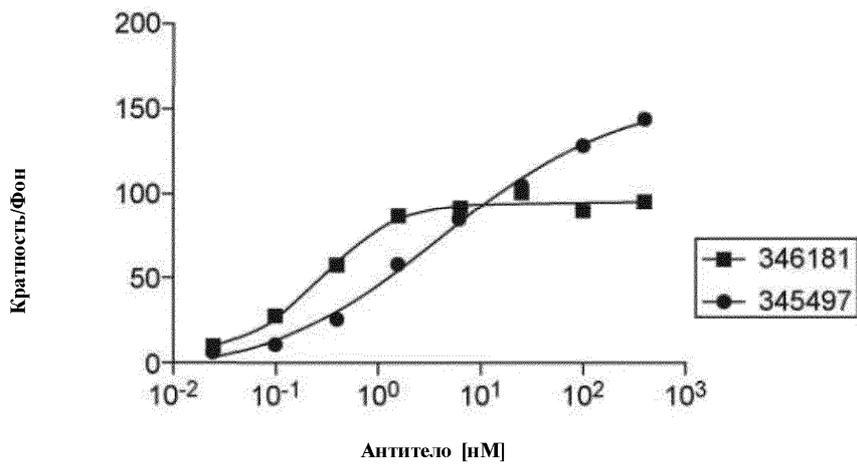
Фиг. 1А

Сывороточные титры - ПСМА, CFA/IFA



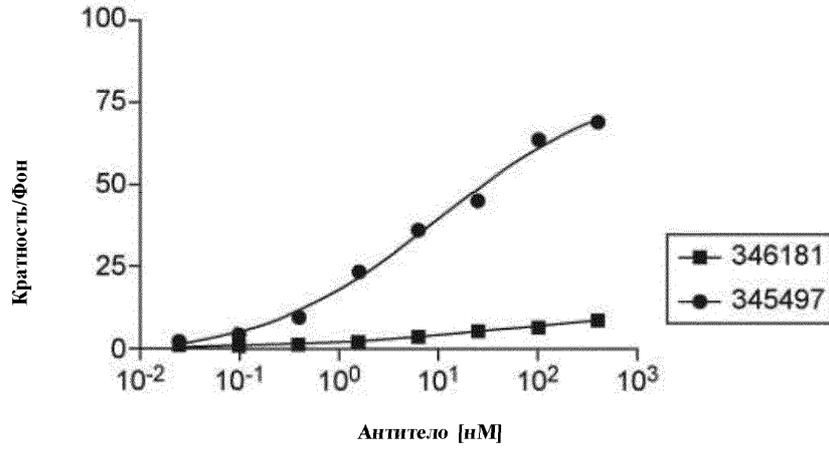
Фиг. 1В

Связывание клеток: LNCaP



Фиг. 2А

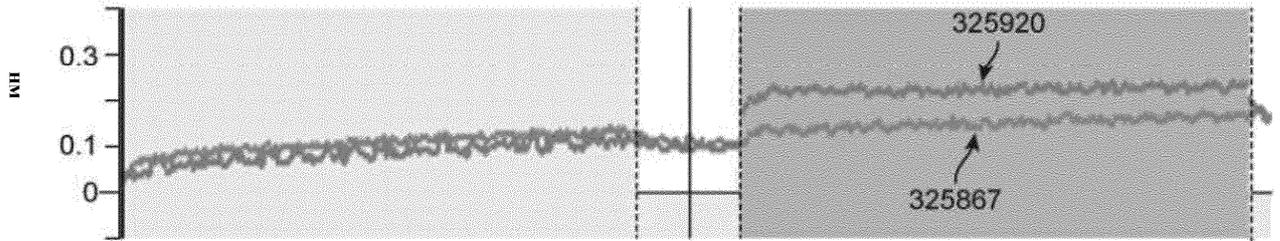
Связывание клеток: ПСМА яванского макака + 293F



Фиг. 2В

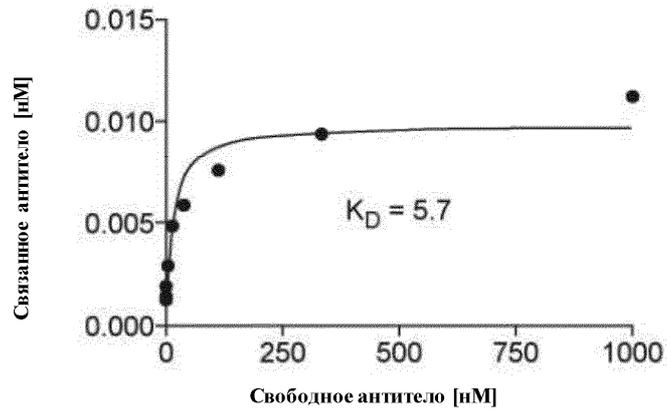
Загруженное первое антитело: 325867

Загруженное второе антитело: или 325867 или 325920



Фиг. 3

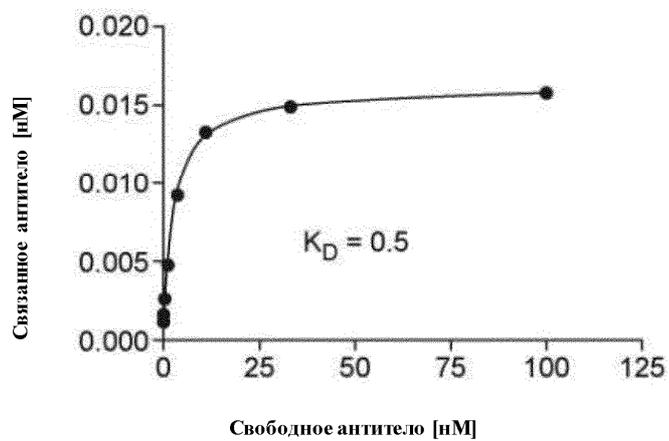
График Скэтчарда
346181xCD3



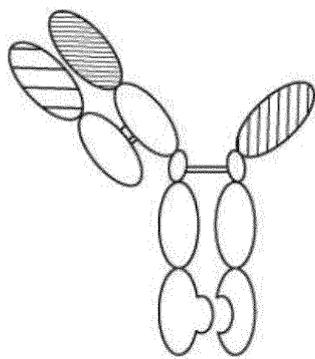
Фиг. 4А

046268

График Скэтчарда
350123xCD3

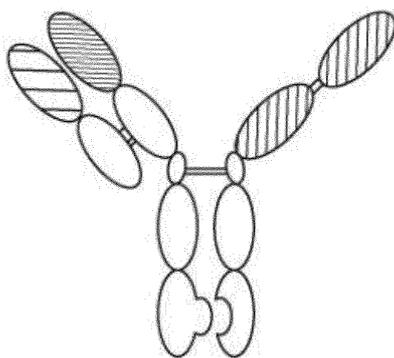


Фиг. 4В



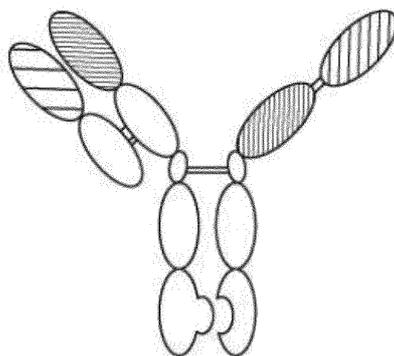
анти-CD3 x одновалентное,
моноспецифическое анти-ПСМА

Фиг. 5А



Анти-CD3 x двухвалентное,
бипарагонное анти-ПСМА

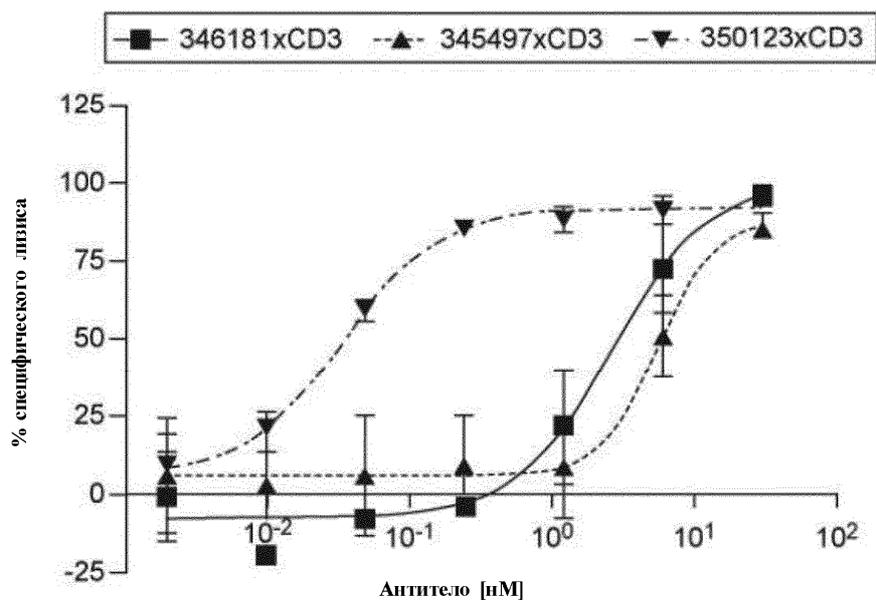
Фиг. 5В



Анти-CD3 х двухвалентное,
бипаратопное анти-ПСМА

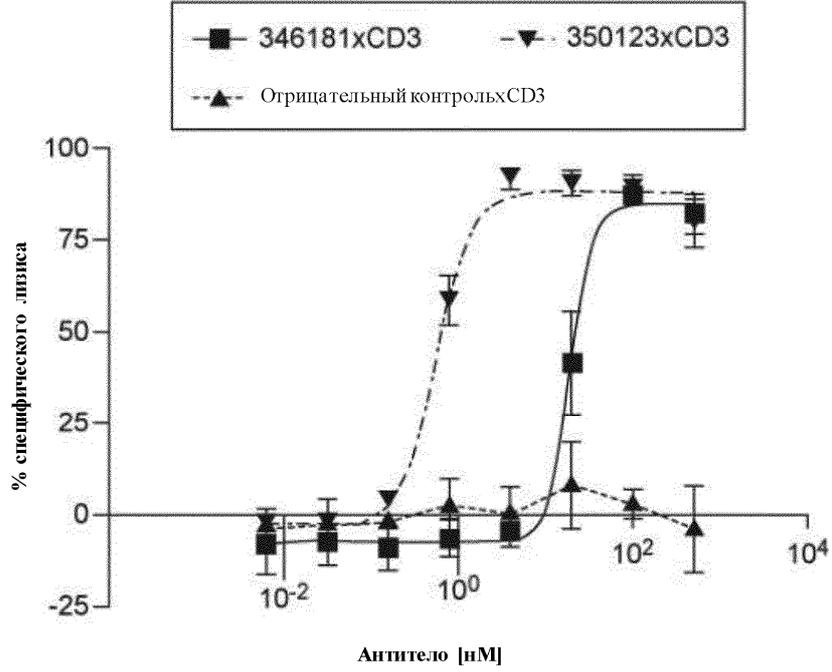
Фиг. 5С

Опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных
клеток
с использованием предварительно активированных Т-
клеток



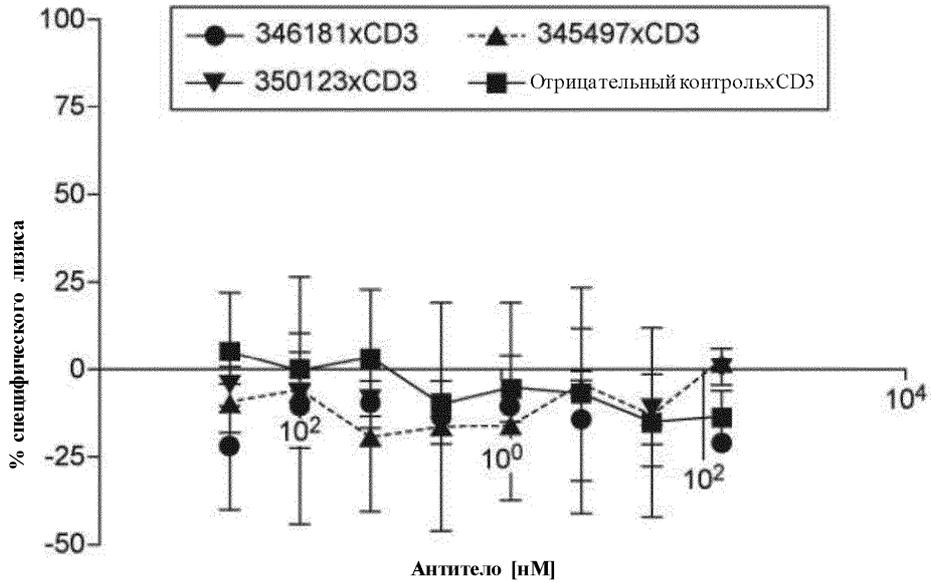
Фиг. 6

Опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток с использованием нестимулированных Т-клеток



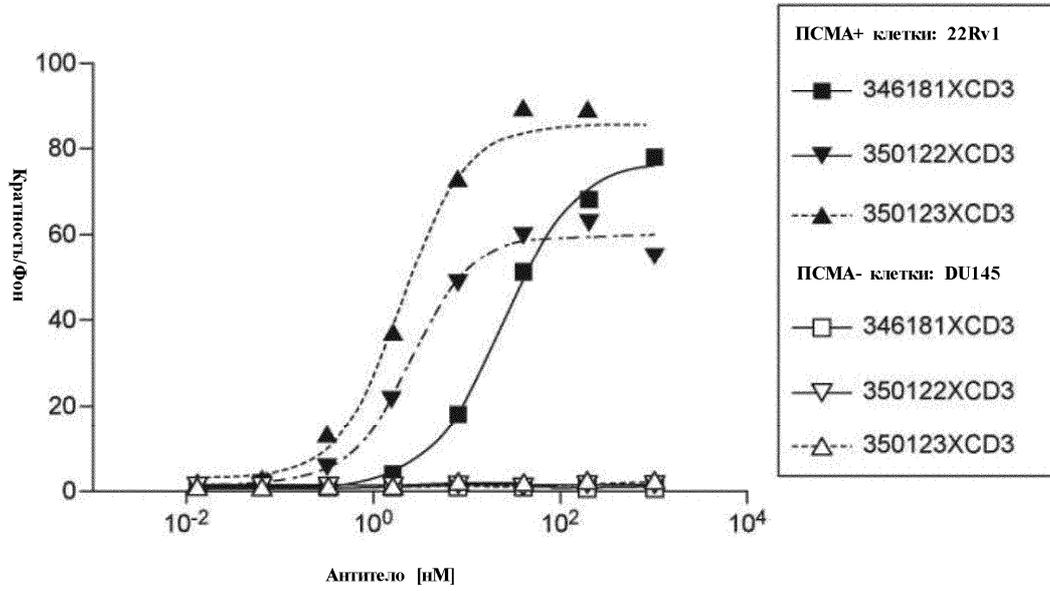
Фиг. 7

Биспецифические антитела не лизируют ПСМА-отрицательные клетки



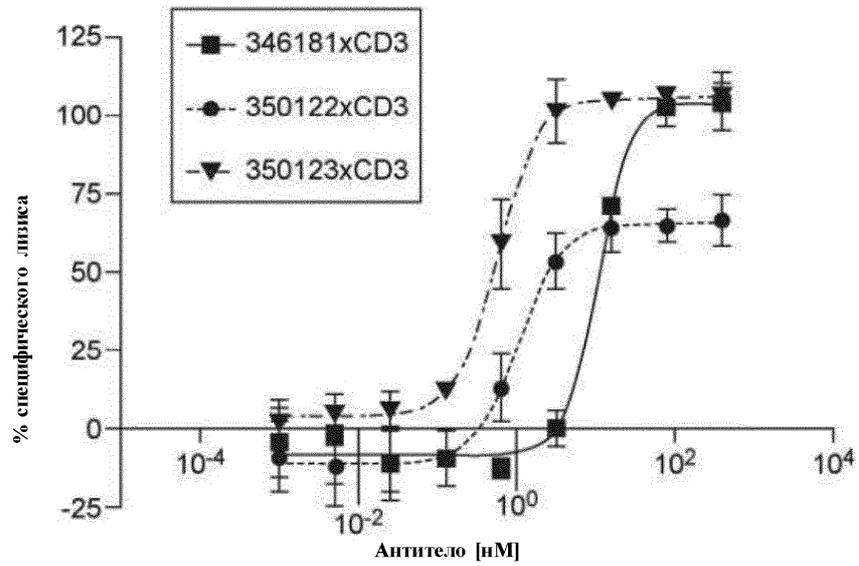
Фиг. 8

Связывание биспецифических антител к ПСМАхCD3 с
Положительные и отрицательные по ПСМА клетки



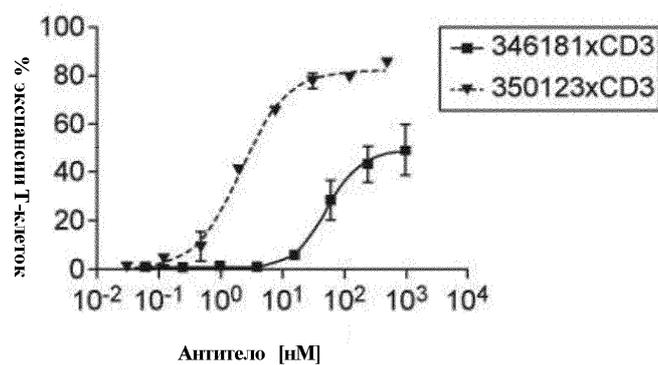
Фиг. 9

Опосредованный Т-клетками лизис ПСМА-положительных клеток



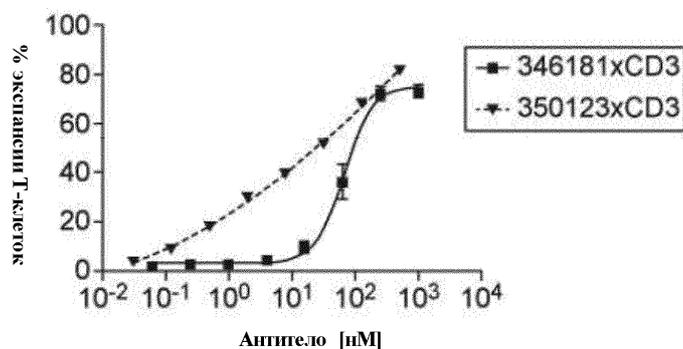
Фиг. 10

Проллиферация Т-клеток: LNCaP



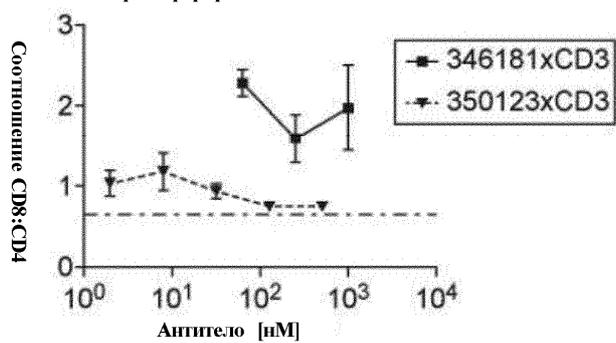
Фиг. 11А

Проллиферация Т-клеток: 22Rv1



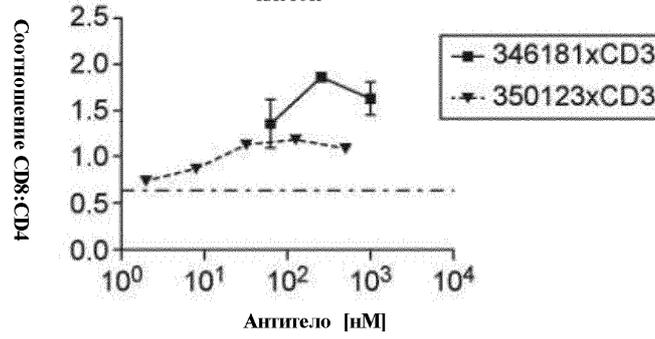
Фиг. 11В

Соотношение CD8: CD4 Т-лимфоцитов для пролиферирующих Т-клеток



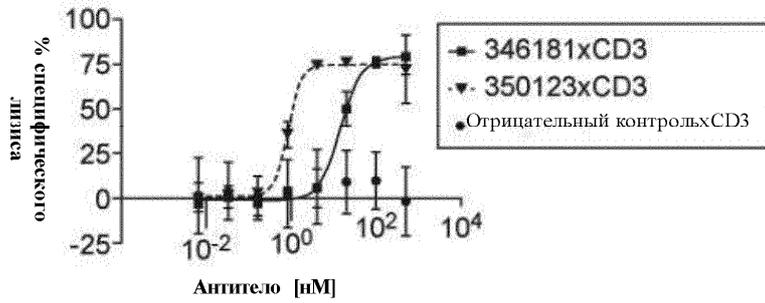
Фиг. 11С

Соотношение CD8: CD4 Т-лимфоцитов для пролиферируемых Т-клеток



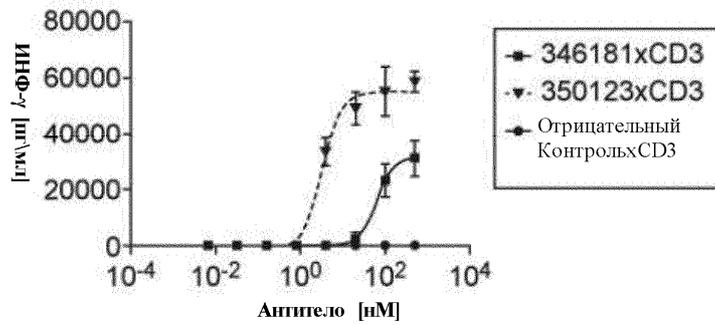
Фиг. 11D

Опосредованный Т-клетками лизис клеток LNCaP



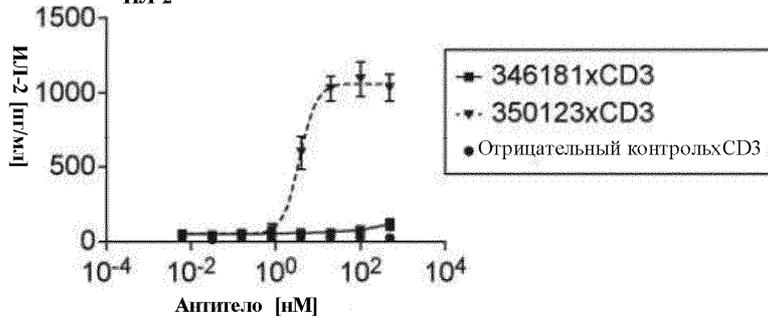
Фиг. 12А

Высвобождение цитокинов: ИФН-γ



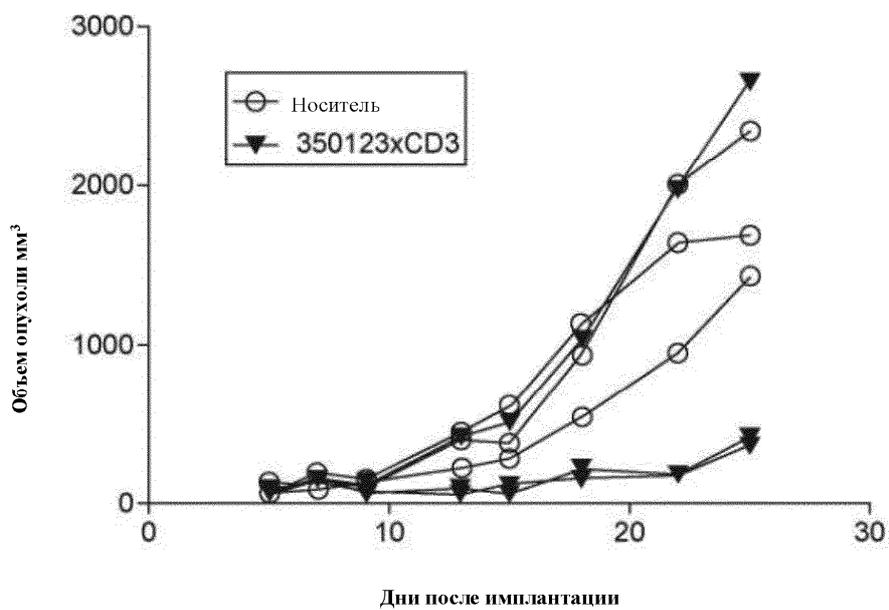
Фиг. 12В

Высвобождение цитокинов: ИЛ-2



Фиг. 12С

Ксенотрансплантат 22Rv1



Фиг. 13

