

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046641**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092839

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(54) **АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С PSMA, И ВИДЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/676,099**

(32) **2018.05.24**

(33) **US**

(43) **2021.02.12**

(86) **PCT/IB2019/054189**

(87) **WO 2019/224718 2019.11.28**

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

(56) **WO-A2-2010037836**
"FOLH1 HUMAN", 1 June 1994
(1994-06-01), XP002794656, Retrieved from the
Internet:URL:Sehttps://
www.uniprot.org/uniprot/Q04609.txt [retrieved on
2019-09-27] page 26
WO-A1-2017023761
WO-A2-2016179534
WO-A1-2019125982

(72) Изобретатель:
**Андерсон Гленн Марк, Буш Тэмми,
Фернандес Кардосо Роза Мария, Чи
Эллен, Коннор Джудит Энн, Динх
Тай Куанг, Доминго Деррик Лемон,
Джоунс Джон Майкл, Кейн Коллин,
Мэттсон Бетани Кей, Макдевитт
Тереза Мари, Муни Джилл Мари,
Тавадрос Ричард Стефен, Чжоу Хун
Мими (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным антителам, которые иммуноспецифически связываются с простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA), или их антигенсвязывающим фрагментам, а также биспецифическим антителам, которые иммуноспецифически связываются с PSMA и кластером дифференцировки 3 (CD3).

046641
B1

046641
B1

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 30 апреля 2019 г., называется JBI5156WOPCT1_SL.txt и имеет размер 272 443 байт.

Область техники

Изобретение, представленное в настоящем документе, относится к моноклональным антителам, которые иммуноспецифически связываются с простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA), мультиспецифическим антителам, которые иммуноспецифически связываются с PSMA и кластером дифференцировки 3 (CD3), и способам продуцирования и применения описанных антител.

Предпосылки создания изобретения

Рак предстательной железы является вторым по распространенности видом рака у мужчин во всем мире и шестой ведущей причиной смерти связанной с раком. Во всем мире ежегодно регистрируется приблизительно 1100000 новых случаев заболевания и 300000 смертельных исходов, что составляет 4 процента всех случаев смерти по причине рака. Согласно оценкам ожидается, что из каждых 6 мужчин у 1 будет диагностировано данное заболевание в течение его жизни. В США более 90% случаев рака предстательной железы выявляют на локальной или региональной стадии. На этих ранних стадиях 5-летняя выживаемость приближается к 100%. Однако при метастазировании рака 5-летняя выживаемость снижается до 28%, и сохраняется потребность в эффективных способах лечения рака предстательной железы на поздней стадии.

Простатспецифический мембранный антиген (PSMA) представляет собой мембранный белок II типа, который сильно экспрессируется при простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) - состоянии, при котором некоторые клетки предстательной железы начинают выглядеть и вести себя аномально, и при первичных и метастатических раках предстательной железы [Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Экспрессия простатспецифического мембранного антигена при простатической интраэпителиальной неоплазии и аденокарциноме: исследование 184 случаев. Cancer 1998;82 (11):2256-2261.]. Экспрессия PSMA в раковых тканях коррелирует со стадией заболевания и шкалой Глисона [Kawakami M, Nakayama J. Повышенная экспрессия гена простатспецифического мембранного антигена при раке предстательной железы, выявленная гибридизацией in situ. Cancer Res 1997;57(12):2321-2324.]. Экспрессия PSMA также выше в клетках рака предстательной железы пациентов с гормонорезистентным раком предстательной железы [Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Kongarba A, Schellhammer PF, Moriarty R. Повышение экспрессии простатспецифического мембранного антигена после антиандрогенной терапии. Urology 1996;48(2):326-334.], и повышенная экспрессия PSMA является независимым маркером рецидива заболевания [Mitsiades CS, Lembessis P, Sourla A, Milathianakis C, Tsintavis A, Koutsieris M. Молекулярная стадия по данным анализа ОТ-ПЦР для PSA и PSMA в образцах периферической крови и костного мозга является независимым прогностическим фактором времени до биохимического нарушения после радикальной простатэктомии при клинически локализованном раке предстательной железы. Clin Exp Metastasis 2004;21(6):495-505.]. Высокий уровень экспрессии PSMA коррелирует с ранним рецидивом простатспецифического антигена (PSA) при хирургическом лечении рака предстательной железы. Уровни экспрессии PSMA коррелируют с агрессивной способностью заболевания и, таким образом, сильно поддерживают PSMA в качестве превосходной мишени для характеристики рака предстательной железы и последующей терапии.

Текущие способы лечения рака предстательной железы включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию и гормональную терапию. Если раковые заболевания предстательной железы растут, несмотря на снижение уровней тестостерона посредством гормональной терапии, варианты лечения ограничены. Как правило, к гормональной терапии последовательно добавляют противораковую вакцину сипулейцел-Т, радиофармацевтический агент (такой как хлорид радия-223), вторичные гормональные терапевтические средства (такие как абиратерон или энзалутамид) и/или химиотерапевтические средства (доцетаксел и кабазитаксел). Хотя каждый из этих способов лечения способен замедлять рост рака в течение нескольких месяцев и ослаблять симптомы, вызванные заболеванием, в конечном счете заболевание становится резистентным к ним. Это подчеркивает потребность в более совершенном лечении и эффективных видах терапии распространенного рака предстательной железы с экспрессией PSMA.

Изложение сущности изобретения

В настоящем документе предлагаются антитела, иммуноспецифически связывающиеся с PSMA Pan troglodytes (шимпанзе), Macaca fascicularis (макак-крабод, макака, яванский макак) и/или человека, и их антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные PSMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Более того, описаны способы применения предложенных антител и антигенсвязывающих фрагментов. Например, PSMA-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, обратного развития или стабильности течения рака, экспресси-

рующего PSMA; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим PSMA, и, следовательно, ответит ли он на лечение PSMA-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими (биспецифическими, триспецифическими и т.д.) антителами к PSMA и CD3, описанными в настоящем документе.

В настоящем документе также предлагаются мультиспецифические антитела, иммуноспецифически связывающиеся с PSMA и CD3, и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела к PSMA x CD3, клетки, экспрессирующие предложенные антитела, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифические антитела. Более того, описаны способы применения предложенных мультиспецифических антител. Например, мультиспецифические антитела к PSMA x CD3 можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, обратного развития или стабильности течения рака, экспрессирующего PSMA; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раком, экспрессирующим PSMA, и, следовательно, ответит ли он на лечение PSMA-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к PSMA x CD3, описанными в настоящем документе.

Psma-специфические антитела

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* (макак-крабоед, макака, яванский макак) и/или человека, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42 и 43 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42 и 43 соответственно и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно или с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123 и 124 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123 и 124 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 23, 12, и 24 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* (макак-крабоед, макака, яванский макак) и/или человека, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44 и 45 соответственно.

В изобретении предложено выделенное антитело и его фрагменты, специфически связывающие PSMA Pan troglodytes, *Macaca fascicularis* и/или человека, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44 и 45 соответственно и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1),

NO: 62 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 63, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3 и его фрагменты, содержащие первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 62 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 63, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 152 и VL с SEQ ID NO: 153.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3 и его фрагменты, содержащие первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 75 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 76, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3 и его фрагменты, содержащие первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 75 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 76, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 152 и VL с SEQ ID NO: 153.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3 и его фрагменты, содержащие первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 160 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 65, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3 и его фрагменты, содержащие первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 160 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 65, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 152 и VL с SEQ ID NO: 153.

В изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий участок по изобретению, связанный с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий VH антитела, VL антитела или VH и VL антитела по изобретению.

В изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид, который кодирует VH антитела, VL антитела или VH и VL антитела по изобретению.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор по изобретению.

В изобретении также предложен способ получения антитела по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

В изобретении также предложен способ лечения синдрома сверхэксперсии PSMA и/или рака у субъекта, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по изобретению в течение времени, достаточного для лечения рака.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело по изобретению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэнинга соединений к PSMA с клетками LNCaP.

На фиг. 2 представлены кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэнинга соединений с клетками HEK, экспрессирующими PSMA шимпанзе.

На фиг. 3 представлены кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэнинга соединений к PSMA с клетками HEK, экспрессирующими PSMA яванского макака.

На фиг. 4 представлена аминокислотная последовательность SP34 с последовательной нумерацией. CDR в определении AbM (K.R. Abhinandan and A.C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839) подчеркнуты. Ser230 представляет собой последний остаток HC в расщепленном папаином Fab. Остатки 231-455 получены из IGHG3_MOUSE (мышиный IgG3, изоформа 2).

На фиг. 5 представлены адаптированные для человеческого каркаса (HFA) варианты V_H (SEQ ID NO: 104, 102, 115 и 116 соответственно, в порядке появления) и V_L (SEQ ID NO: 103, 117 и 105 соответственно, в порядке появления). Нумерация является последовательной; CDR в определении AbM подчеркнуты; остатки, отличающиеся от SP34, выделены жирным шрифтом; обратные мутации в вариантах HFA выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. На фигуре представлены последовательности VH и VL для SP34 в SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно.

На фиг. 6 представлено связывание HFA-вариантов SP34 с первичными человеческими Т-клетками.

На фиг. 7 представлено связывание HFA-вариантов SP34 с первичными Т-клетками яванского макака.

На фиг. 8 показано, что HFA-варианты SP34 активируют первичные человеческие Т-клетки *in vitro*. Отрицательные контроли показаны белым, а положительные контроли показаны черным.

На фиг. 9 показано, что HFA-варианты SP34 активируют первичные Т-клетки яванского макака *in vitro*. Отрицательные контроли показаны белым, а положительные контроли показаны черным. Не относящееся к CD3ε перекрестно-реагирующее антитело G11 служило дополнительным отрицательным контролем.

На фиг. 10А и 10В представлена корреляция связывания и активации HFA-вариантами SP34. Значения среднего связывания и средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD69 представлены в зависимости друг от друга для человека (фиг. 10А) и яванского макака (фиг. 10В).

На фиг. 11А-11F показаны кривые титрования для связывания биспецифических антител к PSMA X CD3 с клетками LNCaP.

На фиг. 12 показаны кривые титрования для биспецифических антител к PSMA X CD3, связывающихся с PSMA-экспрессирующими клетками НЕК шимпанзе.

На фиг. 13 показаны кривые титрования для биспецифических антител к PSMA X CD3, связывающихся с PSMA-экспрессирующими клетками НЕК яванского макака.

На фиг. 14 показаны кривые титрования для биспецифических антител к PSMA X CD3, связывающихся с человеческими PSMA-экспрессирующими клетками НЕК.

На фиг. 15 показаны кривые титрования биспецифических антител к PSMA X CD3 для человеческих PSMA-экспрессирующих клеток НЕК в анализе токсичности опосредованного Т-клетками хрома.

На фиг. 16 показано сравнение средних и высокоаффинных плеч к CD3 в биспецифических антителах к PSMA X CD3 в анализе токсичности опосредованного Т-клетками хрома для клеток НЕК, экспрессирующих человеческий PSMA.

На фиг. 17 показаны кривые титрования для биспецифических антител к PSMA X CD3 для клеток LNCaP в анализе токсичности опосредованного Т-клетками хрома.

На фиг. 18 показаны кривые титрования биспецифических антител к PSMA X CD3 для PSMA-экспрессирующих клеток НЕК яванского макака в анализе токсичности опосредованного Т-клетками хрома.

На фиг. 19А, 19В и 19С показаны кривые титрования для PS3B27 и контрольных биспецифических антител для PSMA-экспрессирующих клеток НЕК и клеток LNCaP человека и яванского макака в анализе опосредованной Т-клетками токсичности каспазы 3/7.

На фиг. 20 показана Т-клеточная активация PS3B27.

На фиг. 21 показано предотвращение онкогенеза в ксенотрансплантатах HEK293-PSMA, обработанных PS3B27 или контрольными биспецифическими антителами, у мышей линии NSG, гуманизированных человеческими моноклеарными клетками периферической крови (PBMC).

На фиг. 22 показаны средние массы тела мышей NSG, гуманизированных PBMC, несущих ксенотрансплантаты HEK293-PSMA, с обработкой PS3B27 и контрольным биспецифическим антителом.

На фиг. 23 показана эффективность PS3B27 и контрольных биспецифических антител в предотвращении онкогенеза в смеси ксенотрансплантатов клеток HEK293-PSMA/Т у самцов бестимусных мышей CD1.

На фиг. 24 показана масса тела самцов бестимусных мышей CD1, несущих ксенотрансплантаты клеток HEK293-PSMA/Т-клеток, обработанных PS3B27 и контрольными биспецифическими антителами.

На фиг. 25 показана общая структура PSMB83 (также известного как PSMM84), связанного с гомодимером ВКД человеческого PSMA.

На фиг. 26 показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с легкой цепью PSMB83 (также известного как PSMM84).

На фиг. 27 показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с тяжелой цепью PSMB83 (также известного как PSMM84).

На фиг. 28 показано сравнение остатков эпитопа PSMB83 (также известного как PSMM84) в последовательностях PSMA человека (SEQ ID NO: 3), мыши (SEQ ID NO: 157) и яванского макака (макаки) (SEQ ID NO: 2). Остатки эпитопа заштрихованы, а дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

На фиг. 29 показаны остатки паратопа PSMB83 (также известного как PSMM84). CDR подчеркнуты, а остатки паратопа заштрихованы. На фигуре раскрыты SEQ ID NO 158 и 159 соответственно, по порядку.

На фиг. 30 представлена карта взаимодействия с прямыми контактами, установленными между PSMA и PSMM83 (также известного как PSMM84). Ван-дер-ваальсовы взаимодействия показаны пунктирными линиями, а водородные связи представлены сплошными линиями со стрелками, указывающими на атомы остова.

На фиг. 31 показаны уровни экспрессии клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению с экспрессией исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 32 показано связывание с человеческим PSMA клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 33 показано связывание с PSMA яванского макака клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 34 показано связывание с человеческим PSMA клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMB83. Исходные значения люминесценции нормализовали по уровням экспрессии Fab.

На фиг. 35 показано связывание с PSMA яванского макака клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMB83. Исходные значения люминесценции нормализовали по уровням экспрессии Fab.

На фиг. 36 показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 37 показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 38 показаны результаты по PSMA-отрицательному связыванию с клетками PC3 биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 39 показаны результаты биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью в функциональном анализе уничтожения клеток.

На фиг. 40 показана противоопухолевая эффективность PS3B79 в модели ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных T-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм³ \pm СОС (*, p < 0,0001).

На фиг. 41 показана противоопухолевая эффективность PS3B90 в модели ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных T-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм³ \pm СОС (*, p < 0,001).

На фиг. 42 показано влияние PS3B72 (PSMA \times CD3) на установленную модель полученного от пациента ксенотрансплантата LuCaP 86.2 предстательной железы у гуманизированных T-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP 86.2 измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм³ \pm СОС (*, p < 0,0001).

Подробное описание изобретения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычно специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

Термины "специфическое связывание", или "специфически связывает", или "связывает" относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-8} M или менее, например, около 1×10^{-9} M или менее, около 1×10^{-10} M или менее, около 1×10^{-11} M или менее или около 1×10^{-12} M или менее, как правило, с K_D , которая по меньшей мере в сто раз ниже его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерять с помощью стандартных процедур. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, в отношении такого же антигена от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

"Антитела" означает в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую

модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. "Полноразмерные молекулы антител" состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

"Области, определяющие комплементарность (CDR)" представляют собой "антигенсвязывающие сайты" в антителе. CDR можно определять с помощью различных терминов: (i) Области, определяющие комплементарность (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на вариабельности последовательности (Wu and Kabat (1970) *J Exp Med* 132:211-50; Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) Термин "гипервариабельные области", "HVR" или "HV", три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относится к областям переменных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia and Lesk (Chothia and Lesk (1987) *Mol Biol* 196:901-17). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между определениями CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., (2003) *Dev Comparat Immunol* 27:55-77. Термины "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" и "LCDR3" в настоящем документе включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Kabat, Chothia или IMGT, если в описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термины "фрагменты антитела" и "антигенсвязывающие фрагменты", относятся к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий участок тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител или антигенсвязывающие фрагменты включают хорошо известные фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), содержащие один домен VH. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047.

Термин "моноклональное антитело" относится к популяции антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи за исключением возможных известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела, как правило, связываются с одним антигенным эпитопом, за исключением биспецифических моноклональных антител, которые связываются с двумя отличными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, или моновалентным, бивалентным или мультивалентным. Биспецифическое антитело включено в термин "моноклональное антитело".

Термин "выделенное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, которое по существу не содержит других антител, имеющих другие значения антигенной специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающее PSMA, по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от PSMA). В случае биспецифических антител PSMA x CD3 биспецифическое антитело специфически связывает как PSMA, так и CD3 и по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от PSMA и CD3. Термин "выделенное антитело" охватывает антитела, выделенные так, что они имеют более высокую степень чистоты, такие как антитела, являющиеся чистыми на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, в котором антигенсвязывающие участки получены из видов, отличных от человека, а каркасные области переменной области получены из

последовательностей иммуноглобулинов человека. Гуманизированное антитело может содержать замены в каркасных областях, в результате чего каркасная область может не являться точной копией экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или генных последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Термин "антитело человека" относится к антителу, имеющему переменные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если переменные области антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. "Человеческое антитело" может содержать аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулином зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным встраиванием замен в каркас или антигенсвязывающий сайт, или оба варианта. Как правило, "человеческое антитело" по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и международной патентной публикации № WO 2009/085462.

Человеческие антитела, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть получены с помощью таких систем, как фаговый дисплей, включая синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антитела, что позволяет получать антитела, не экспрессирующиеся зародышевой линией человека *in vivo*.

Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин "рекомбинантный" относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. "Эпитоп" антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами антитела, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейных последовательностей аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи", или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означают остатки легкой и тяжелой цепей антитела, контактирующие, соответственно, с антигеном или в целом "остатки паратопа антитела" означают те аминокислоты антитела, которые контактируют с антигеном.

Термин "биспецифический" относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Ran troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин "мультиспецифический" относится к антителу, которое специфически связывается с двумя или более разными антигенами или двумя или более разными эпитопами в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна,

например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Термин "вектор" относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Векторные полинуклеотиды обычно содержат некоторые функциональные элементы, такие как точки начала репликации, сигналы полиаденилирования или селективные маркеры, служащие для облегчения дупликации или поддержания данных полинуклеотидов в биологической системе, такой как клетка, вирус, животное, растение, а также в реконструированных биологических системах, использующих биологические компоненты, способные к дупликации вектора. Векторный полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или их гибрид, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу.

Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечная и одноцепочечная ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "полипептид" или "белок" относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

"Проточная цитометрия" представляет собой технологию, применяемую для определения физических и химических характеристик частиц в текучей среде по мере их прохождения через по меньшей мере один лазер. Компоненты клеток флуоресцентно метят, а затем возбуждают лазером для излучения света с различными длинами волн (Adan, et al, *Critical Reviews in Biotechnology* (2016) 1549-7801).

"Антиидиотипическое (анти-Id) антитело" представляет собой антитело, которое распознает антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Специалистам в данной области техники по существу известен способ получения или приготовления антиидиотипического антитела. (Lathey, J. et al *Immunology* 1986 57(1):29-35). Антиидиотипическое антитело может быть антиген-блокирующим или неблокирующим. С помощью блокирующего антигена анти-Id антитела можно обнаруживать свободное антитело в пробе (например, антитело к PSMA, к CD3 или биспецифическое антитело PSMA x CD3 по изобретению, описанное в настоящем документе). Неблокирующее антиидиотипическое антитело можно использовать для обнаружения общего антитела (свободного, частично связанного с антигеном или полностью связанного с антигеном) в образце. Антиидиотипическое антитело можно получить путем иммунизации животного антителом, к которому получают антиидиотипическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антиидиотипическое антитело применяется для обнаружения уровня терапевтических антител (например, антител к PSMA, к CD3 или биспецифических антител PSMA x CD3 по изобретению, описанных в настоящем документе) в пробе.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Антитело к антиидиотипическому антителу может быть идентично по эпитопам первичному мкАт, которое индуцировало образование антиидиотипического антитела. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Антитела анти-Id можно подвергать вариациям (таким образом получая варианты антитела анти-Id) и/или получению производных любой приемлемой методикой из тех, что описаны в других разделах настоящего документа в отношении антител, специфически связывающих PSMA или CD3 или биспецифических антител PSMA x CD3.

PSMA относится к простатспецифическому мембранному антигену. Аминокислотная последовательность PSMA *Pan troglodytes* (также называемых шимпанзе) показана в SEQ ID NO: 1. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность PSMA *Macaca fascicularis* (также называемого яванским макаком, макаком или макаком-крабоедом) показана в SEQ ID NO: 2. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность зрелого PSMA человека приведена в SEQ ID NO: 3. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 3.

CD3 относится к T-клеточному антигенному рецептору. В тексте описания термин "CD3-специфический" относится к антителам, которые специфически связываются с рецепторным комплексом T-клеток. В частности, антитела связываются с полипептидом CD3-эпсилон, который вместе с CD3-

гамма, -дельта и -дзета, а также гетеродимерами Т-клеточных рецепторов альфа/бета и гамма/дельта, образует комплекс Т-клеточный рецептор - CD3. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. Для иммунного ответа необходим CD3.

Термин "в комбинации с" означает, что два или более терапевтических средства вместе вводят субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термины "сверхэкспрессировать", "сверхэкспрессированный" и "сверхэкспрессия" взаимозаменяемо относятся к пробе, такой как раковая клетка, злокачественная клетка или раковая ткань, которая имеет измеримо более высокие уровни PSMA по сравнению с эталонной пробой. Сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию белка в пробе можно измерять с помощью известных анализов, например, твердофазного ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммунного анализа на живых или лизированных клетках. Экспрессию и сверхэкспрессию полинуклеотида в образце можно измерять, например, с помощью методик флуоресцентной гибридизации *in situ*, саузерн-блоттинга или ПЦР. Белок или полинуклеотид сверхэкспрессируется, когда уровень белка или полинуклеотида в образце в по меньшей мере 1,5 раза выше по сравнению с эталонным образцом. Выбор эталонного образца хорошо известен.

Термин "проба" относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами проб являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитные жидкости, такие как связанные с не-солидными опухолями, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например, среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т.п., биоптаты тканей, аспираты, взятый тонкой иглой, или ткань опухоли после хирургической резекции.

Термин "раковая клетка" или "опухолевая клетка" относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфицированием трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/злокачественное новообразование проявляется в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркера, специфических для опухоли, инвазивности, росте опухоли у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)). Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Термин "эффекторные антигены" определяет антигены из клеток иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена, высвобождение цитокинов. Такие эффекторные антигены получены, например, без ограничений, из Т-клеток и естественных клеток-киллеров (НК). Примеры подходящих специфичностей для эффекторных антигенов включают, без ограничений, CD3 или субъединицы CD3, такие как CD3 ϵ для Т-клеток и CD16 для НК-клеток. Такие молекулы клеточной поверхности эффекторных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток. Эффекторные клетки представляют собой клетки иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена, высвобождение цитокинов. Такие эффекторные клетки представляют собой, например, без ограничений, Т-клетки, естественные клетки-киллеры (НК), гранулоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и антигенпрезентирующие клетки. Примеры подходящей специфичности для эффекторных клеток включают, без ограничений, CD2, CD3 и субъединицы CD3, такие как CD3 ϵ , CD5, CD28 и другие компоненты Т-клеточного рецептора (TCR) для Т-клеток; CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335

(NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C и NKG2D, DNAM, NCR для NK-клеток; CD18, CD64 и CD89 для гранулоцитов; CD18, CD32, CD64, CD89 и маннозный рецептор для моноцитов и макрофагов; CD64 и маннозный рецептор для дендритных клеток; а также CD35. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти специфичности, т.е. молекулы клеточной поверхности, эффекторных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток при связывании биспецифических или мультиспецифических молекул с такой молекулой клеточной поверхности и, таким образом, индуцируя цитоллиз или апоптоз.

Термины "биспецифическое антитело к PSMA x CD3", "антитело к PSMA/CD3", "биспецифическое антитело против PSMA x CD3" или "антитело против PSMA/CD3" относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий PSMA, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие PSMA и CD3, обычно представляют собой пары VH/VL. Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с PSMA, или с CD3.

Термин "валентный" относится к наличию в молекуле установленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины "моновалентный", "двухвалентный", "четырёхвалентный" и "шестивалентный" относятся к наличию в молекуле одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена. Термин "мультивалентный" относится к наличию двух или более сайтов связывания, специфических для антигена в молекуле.

Термин "антигенспецифическая CD4+ или CD8+ Т-клетка" относится к CD4+ или CD8+ Т-клетке, активированной специфическим антигеном или его иммуностимулирующим эпитопом.

Термин "пациент" включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин "отличное от человека животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и отличных от млекопитающих животных, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д. Если не указано иное, термины "пациент" или "субъект" применяются взаимозаменяемо.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с каталогом ЕС, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

В настоящем документе применяются традиционные одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однбуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамин	Glu	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H

Изолейцин	Ile	I
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	Ж
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Композиции изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела и их фрагменты, которые специфически связывают PSMA, и мультиспецифические антитела, которые специфически связывают PSMA и CD3, и их фрагменты. В настоящем изобретении предложены полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие антитела по изобретению, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Антитела и их фрагменты, которые связываются с PSMA, связываются с целевым антигеном шимпанзе. В одном варианте осуществления антитела и их фрагменты связываются с целевыми антигенами PSMA человека и макака с аффинностями в пределах 5 раз относительно друг друга. Другими словами, кратность разницы в связывании антител равна менее 5. В этом случае идентичную молекулу антитела можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля PSMA у приматов, так и в качестве лекарственного средства для людей. Другими словами, одна и та же PSMA-специфическая молекула может применяться в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях с участием людей. Это приводит к очень сопоставимым результатам и значительно более высокой прогностической способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. Поскольку домен PSMA обладает межвидовой специфичностью, то есть реагирует с антигенами человека и макака, антитело или его фрагменты по изобретению можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля этих связывающих доменов у приматов, так и в идентичной форме как лекарственное средство для людей.

В настоящем изобретении также предложены мультиспецифические антитела, которые специфически связываются с PSMA. Согласно изобретению биспецифическое, то есть бифункциональное, антитело можно использовать для воздействия на две разные терапевтические мишени или для выполнения двух разных функций. Такие антитела можно использовать, например, для рекрутирования иммунной эффекторной клетки, например, Т- или NK-клетки, к конкретной клетке-мишени. Известны и исследуются различные молекулы на основе фрагментов антител, например, для лечения злокачественного новообразования. Мультиспецифическое антитело согласно изобретению может представлять собой триспецифическое антитело для двойного нацеливания на опухолевые клетки - это трифункциональные структуры, которые могут быть выполнены с возможностью нацеливания на две различные мишени/эпитопы на опухолевой клетке и с третьей функциональностью связывания с высокой аффинностью либо с Т-клетками, либо с NK-клетками. Триспецифические антитела, нацеленные на два разных эпитопа опухоли и взаимодействующие с Т- или NK-клетками, лизируют опухолевые клетки, которые экспрессируют обе мишени. Такие молекулы могут быть получены с помощью форматов антител, известных в данной области и подробно описанных в настоящем документе. (WO 20151842071, WO 2015158636, WO 2010136172, WO 2013174873). В варианте осуществления триспецифического антитела изобретения мультиспецифическое антитело может быть специфичным к PSMA и второму отдельному антигену на той же или другой опухолевой клетке и дополнительно специфичным к эффекторной клетке, в частности Т-клетке или NK-клетке.

В настоящем изобретении также предложено биспецифическое антитело к PSMA x "эффекторному антигену". В одном варианте осуществления эффекторный антиген для биспецифического антитела к PSMA x "эффекторному антигену" представляет собой CD3. В настоящем изобретении было обнаружено, что можно получить биспецифическое антитело к PSMA x CD3, в котором идентичная молекула может быть использована в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследова-

ниях и даже в терапии у людей. Это связано с идентификацией биспецифического антитела к PSMA x CD3, которое, помимо связывания с PSMA человека и CD3 человека, соответственно, также связывается с гомологами антигенов шимпанзе и макака. Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по изобретению можно использовать в качестве терапевтического агента против различных заболеваний, включая, но не ограничиваясь, злокачественное новообразование. Ввиду вышеизложенного отпадает необходимость в конструировании суррогатного целевого биспецифического антитела к PSMA x CD3 для тестирования на филогенетически далеких (от человека) видах. В результате идентичная молекула может использоваться в доклинических исследованиях на животных, поскольку предназначена для введения людям в клинических испытаниях, а также после регистрации и одобрения Управлением по контролю за изделиями медицинского назначения. Возможность использования той же молекулы для доклинического исследования на животных, что и при последующем введении людям, практически устраняет или, по меньшей мере, значительно снижает опасность того, что данные, полученные при доклинических исследованиях на животных, имеют ограниченную применимость к человеку. Вкратце, получение данных доклинической безопасности у животных, использующих ту же молекулу, которая фактически будет введена людям, в значительной степени обеспечивает применимость данных к значимому для человека сценарию. Напротив, в традиционных подходах с использованием суррогатных молекул указанные суррогатные молекулы должны быть молекулярно адаптированы к исследуемой системе на животных, используемой для доклинической оценки безопасности. Таким образом, молекула, применяемая при лечении людей, фактически отличается последовательностью, а также, вероятно, структурой от суррогатной молекулы, применяемой при доклиническом исследовании, по фармакокинетическим параметрам и/или биологической активности, вследствие чего данные, полученные при доклиническом исследовании на животных, имеют ограниченную применимость/переносимость к человеку. Применение суррогатных молекул требует конструирования, производства, очистки и определения характеристик полностью нового конструкта. Это приводит к дополнительным затратам на разработку, и получение этой молекулы требует времени. В целом, суррогаты необходимо разрабатывать отдельно в дополнение к фактическому лекарственному средству, которое будет использоваться в терапии у людей, так что необходимо проводить две линии разработки для двух молекул. Таким образом, основное преимущество биспецифического антитела к PSMA x CD3 согласно изобретению, проявляющего межвидовую специфичность, описанную в настоящем документе, заключается в том, что идентичную молекулу можно использовать для терапевтических агентов у людей и доклинических исследований на животных.

Другим основным преимуществом антитела и мультиспецифического антитела согласно изобретению является его применимость для доклинического исследования у различных приматов. Поведение потенциального лекарственного средства у животных в идеале должно служить показателем ожидаемого поведения этого потенциального лекарственного средства при введении человеку. Таким образом, данные, полученные в ходе такого доклинического исследования, должны по существу иметь высокую прогностическую силу для человека. Однако, как известно из трагического результата недавнего клинического исследования фазы I для TGN1412 (моноклонального антитела к CD28), потенциальное лекарственное средство может действовать на приматов отличным от людей образом: Хотя в доклинических исследованиях указанного антитела на животных, проведенных на яванских макаках, нежелательных эффектов не наблюдалось, или наблюдались лишь ограниченные нежелательные эффекты, при введении указанного антитела у шести пациентов-людей развилась множественная органная недостаточность (Lancet 368 (2006), 2206-7). Результаты этих критических нежелательных эффектов свидетельствуют о том, что ограничения доклинических испытаний только одним видом (приматов, отличных от шимпанзе) может оказаться недостаточно. Тот факт, что описанное антитело и мультиспецифическое антитело специфически связывают PSMA шимпанзе и яванского макака, может помочь преодолеть проблемы, возникшие в упомянутом выше случае. Соответственно, в настоящем изобретении предложены средства и способы сведения к минимуму различий в видах эффектов при разработке и тестировании лекарственных средств для человека.

В случае антитела и мультиспецифического антитела согласно изобретению также больше не требуется адаптировать испытываемое животное к потенциальному лекарственному средству, предназначенному для введения человеку, например, создавать трансгенных животных. Межвидовая специфичность антитела к PSMA или мультиспецифического антитела согласно изобретению позволяет непосредственно использовать антитело для доклинического испытания на приматах, отличных от шимпанзе, без каких-либо генетических манипуляций с животными. Как хорошо известно специалистам в данной области, подходы, в которых исследуемое животное адаптировано к потенциальному лекарственному средству, всегда несут риск того, что результаты, полученные в ходе доклинического исследования безопасности, являются менее репрезентативными и предсказуемыми для людей вследствие модификации животного. Например, у трансгенных животных белки, кодируемые трансгенами, часто сильно сверхэкспрессируются. Таким образом, полученные данные по биологической активности антитела к данному белковому антигену могут быть ограничены в их прогностическом значении для людей, у которых белок экспрессируется в значительно более низких и физиологических уровнях.

Дополнительным преимуществом применения антитела согласно изобретению, проявляющего

межвидовую специфичность, является тот факт, что можно избежать применения шимпанзе, как вида под угрозой исчезновения, для исследования на животных. Шимпанзе являются наиболее близкими родственниками человека и недавно объединены в семейство человекообразных на основании данных геномного секвенирования (Wildman et al., PNAS 100 (2003), 7181). Следовательно, данные, полученные для шимпанзе, по существу считаются весьма прогностическими для человека. Однако из-за статуса вида под угрозой исчезновения количество шимпанзе, которых можно использовать для медицинских экспериментов, сильно ограничено. Таким образом, как указано выше, содержание шимпанзе для испытаний на животных является дорогостоящим и этически проблематичным. Применение антитела согласно изобретению позволяет избежать как этических проблем, так и финансовой нагрузки в ходе доклинического исследования без вреда для качества, т.е. применимости, полученных данных исследования на животных. В свете этого применение антитела или мультиспецифического антитела согласно изобретению, специфически связывающего PSMA, обеспечивает приемлемую альтернативу для исследований на шимпанзе.

Еще одним дополнительным преимуществом антитела или мультиспецифического антитела согласно изобретению, специфически связывающего PSMA, является способность извлекать множество образцов крови при его применении в рамках доклинического исследования на животных, например в ходе исследований по фармакокинетике на животных. При использовании примата, отличного от шимпанзе, можно гораздо легче получить несколько образцов крови, чем при использовании низших животных, например, мышей. Отбор множества образцов крови позволяет проводить непрерывное исследование параметров крови для определения биологических эффектов, индуцированных антителом или мультиспецифическим антителом согласно изобретению, специфически связывающим PSMA изобретения. Кроме того, отбор множества образцов крови позволяет исследователю оценить фармакокинетический профиль антитела или мультиспецифического антитела согласно изобретению, специфически связывающего PSMA, как определено в настоящем документе. Кроме того, потенциальные побочные эффекты, которые могут быть индуцированы указанным антителом или мультиспецифическим антителом изобретения, специфически связывающим PSMA, что отражено в параметрах крови, могут быть измерены в разных образцах крови, отобранных в ходе введения указанного антитела.

Это позволяет определять потенциальный профиль токсичности антитела или мультиспецифического антитела, связывающего PSMA согласно изобретению, как определено в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, выделенное антитело или его фрагмент антитела, специфически связывающий PSMA, имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

- a) связывает внеклеточный домен (ВКД) PSMA Pan troglodytes с равновесной константой диссоциации (K_D) 25 нМ или менее, при этом K_D измеряется с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C,
- b) связывает клетки LNCaP с расчетной EC_{50} 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие PSMA Macaca fascicularis, с расчетной EC_{50} 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC_{50} между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих PSMA Macaca fascicularis, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC_{50} измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии,
- c) связывает рекомбинантный ВКД PSMA человека (SEQ ID NO: 7), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) и Macaca fascicularis (SEQ ID NO: 5) при равновесной константе диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса ProteOn XPR36 при +25°C;
- d) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток НЕК, экспрессирующих PSMA человека, или клеток НЕК, экспрессирующих PSMA Macaca fascicularis, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом CD3B219 к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7, или
- e) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 3).

Примеры таких антител или их фрагментов представляют собой антитела к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363 и PSMB365, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления выделенное антитело к PSMA или его фрагмент, специфически связывающий PSMA, связывает ВКД PSMA шимпанзе с равновесной константой диссоциации (K_D) около 30 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C, как описано в примере 8. Анализ по измерению аффинности методом SPR с применением Proteon включают в себя анализы, выполняемые при комнатной температуре (например, при температуре 25 °C или около нее), в которых антитело, способное связывать PSMA шимпанзе, захватывают на сенсорном чипе Proteon антителом к Fc (например,

(Jackson ImmunoResearch Laboratory, кат. № 109-005-098) до уровня около 100 RU с последующим введением рекомбинантного ВКД PSMA и сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости потока 50 мкл/мин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, выделенное антитело к PSMA или его связывающий фрагмент, специфически связывающий PSMA, связывает клетки LNCaP с EC_{50} 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие PSMA, яванского макака с EC_{50} 40 нМ или менее, причем различие в расчетных EC_{50} между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих PSMA яванского макака, составляет менее 5 раз, причем связывание клеток измеряют с помощью FACS, как описано в примере 7. Анализы по измерению связывания цельных клеток с помощью FACS выполняют с плотностью 200 000 клеток на лунку в течение 1 ч на льду. Количество антител, связанных с цельными клетками, обнаруживают с помощью меченого вторичного антитела, например, конъюгированного с RPE мышинового антитела к человеческой легкой цепи каппа (Life Technologies, кат. № MH10514) с помощью проточного цитометра для анализа FACS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления выделенное антитело или его фрагмент специфически связываются с PSMA человека, шимпанзе и ВКД PSMA яванского макака с равновесной константой диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C, как описано в примере 8. Анализы по измерению аффинности методом SPR с применением Proteon включают в себя анализы, выполняемые при комнатной температуре (например, при температуре 25 °C или около нее), в которых антитело, способное связывать PSMA шимпанзе, захватывают на сенсорном чипе Proteon антителом к Fc (например, Jackson ImmunoResearch Laboratory, кат. № 109-005-098) до уровня около 100 RU с последующим введением рекомбинантного ВКД PSMA и сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости потока 50 мкл/мин.

Измеренное значение аффинности взаимодействия конкретного антитела/PSMA может изменяться при измерении в разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} , K_{off}), как правило, проводятся в стандартизованных условиях и с использованием стандартизованного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением оборудования Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как среднеквадратичное отклонение (CO)), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в контексте K_D отражает типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное COC для K_D , равной 1×10^{-9} М, составляет до $0,33 \times 10^{-9}$ М.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления выделенное антитело или его фрагмент, специфически связывающие PSMA, демонстрируют опосредованное Т-клетками уничтожение экспрессирующих PSMA клеток LNCaP человека, С42-клеток, экспрессирующих PSMA клеток НЕК или экспрессирующих PSMA клеток НЕК яванского макака при объединении в пару биспецифического антитела с антителом к CD3 CD3B219, причем опосредованное Т-клетками уничтожение измеряют по высвобождению хрома-51, а клетки-мишени культивируют с предварительно активированными Т-клетками в соотношении 5:1 в течение 18-24 ч или по анализу активации каспазы 3/7, как в примере 6. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его фрагмент, специфически связывающие PSMA, демонстрируют опосредованное Т-клетками уничтожение экспрессирующих PSMA клеток LNCaP и С42-клеток человека с EC_{50} около 0,3-0,5 нМ или менее и 0,12-0,03 нМ или менее, соответственно, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом к CD3 CD3B219, причем опосредованное Т-клетками уничтожение измеряют с помощью анализа активации каспазы 3/7, как в примере 9. Экспрессирующие целевой PSMA клетки культивируют с предварительно активированными Т-клетками в соотношении 1:3 в течение 18-24 ч, и расщепление добавленного субстрата каспазы 3/7 приводит к получению флуоресцентного красителя ДНК с ограничением флуоресценции клеточным ядром.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления выделенное антитело или его фрагмент, специфически связывающие PSMA, распознают конформационный эпитоп, причем эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 по данным рентгенокристаллографии, описанной в примере 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело или его фрагмент, специфически связывающие PSMA изобретения, содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в пределах варибельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID

NO: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79 160, 138, 139 или 140, причем HCDR1, HCDR2 и HCDR3 определяются по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело или его фрагменты, специфически связывающие PSMA изобретения содержат LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в пределах варибельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 76, 78, 142, 143 или 144, причем LCDR1, LCDR2 и LCDR определяются по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 8, 14, 20, 25, 31, 36, 46, 53 или 122;

HCDR2 с SEQ ID NO: 9, 15, 21, 26, 32, 37, 42, 44, 54 123, 130, 134, 135 или 137; и

HCDR3 с SEQ ID NO: 10, 16, 22, 27, 33, 38, 43, 45, 48, 52, 55, 124.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит:

LCDR1 с SEQ ID NO: 11, 17, 23, 28, 34, 39, 46, 49 или 131;

LCDR2 с SEQ ID NO: 12, 18, 29, 40, 50 или 133; и

LCDR3 с SEQ ID NO: 13, 19, 24, 30, 35, 41, 47, 51, 132 или 136.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 8, 14, 20, 25, 31, 36, 53 или 122;

HCDR2 с SEQ ID NO: 9, 15, 21, 26, 32, 37, 42, 44, 54, 123, 130, 134, 135 или 137;

HCDR3 с SEQ ID NO: 10, 16, 22, 27, 33, 38, 43, 45, 48, 51, 52, 55 или 124;

LCDR1 с SEQ ID NO: 11, 17, 23, 28, 34, 39, 46, 49 или 131;

LCDR2 с SEQ ID NO: 12, 18, 29, 40, 50 или 133; и

LCDR3 с SEQ ID NO: 13, 19, 24, 30, 35, 41, 47, 51, 132 или 136.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 130 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 134 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 135 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 25, 137 и 27 соответственно;

SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно;

SEQ ID NO: 36, 37 и 38 соответственно;

SEQ ID NO: 31, 42 и 43 соответственно;

SEQ ID NO: 31, 44 и 45 соответственно;

SEQ ID NO: 36, 37 и 48 соответственно;

SEQ ID NO: 36, 37 и 52 соответственно;

SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно; или

SEQ ID NO: 122, 123, и 124 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно;

SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно;

SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно;

SEQ ID NO: 28, 29 и 136 соответственно;

SEQ ID NO: 28, 133 и 132 соответственно;

SEQ ID NO: 34, 12 и 35 соответственно;

SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;

SEQ ID NO: 46, 29 и 47 соответственно;

Последовательности CDR (определенные по Kabat) mAb, полученных
путем фагового пэннинга относительно человеческого PSMA (SEQ ID NO:)

ID FAB	CDR (SEQ ID NO:)			
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB129	H C	NAWIS (8)	WINPESGRANYAQKF QG (9)	ELYLVYSTYYYYAFDY (10)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB130	H C	SYDIS (14)	GIPIEGTANYAQKFQ G (15)	DYPAGYGFDY (16)
	LC	RASQSVSSSYLA (17)	GASSRAT (18)	QQYGSSPLT (19)
PSMB128	H C	SDWMS (20)	AISGNGGSTYADSV KG (21)	DPYYYYDGDSYYGMD V (22)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB127	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSV KG (26)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB124	H C	SYAIS (31)	WISPYNGNANYAQKF QG (32)	DSDRSYNLDY (33)

	LC	RASQSIGWLN (34)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB123	H C	SYWIG (36)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (37)	GLPIWYLDY (38)
	LC	RASQSVASDLA (39)	FASNRAT (40)	QQSITWPFT (41)
PSMB122	H C	SYAIS (31)	WIIPYNGNANYAQKF QG (42)	VNSAALVWERLDY (43)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB123	H C	SYAIS (31)	GIIPFGTANYAQKFQ G (44)	ASRVWHASYGYLDY (45)
	LC	RASQSVSKWLA (46)	DASNRAT (29)	QQRFTAPWT (47)
PSMB120	H C	SYWIG (36)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (37)	GWAYDRGLDY (48)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNY LA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB119	H C	SYWIG (36)	IIYPGDS DTRYSPSFQG (37)	AYHYSKGLDY (52)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNY LA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB126	H C	DY AIS (53)	RIDPIEGTANYAQKFQ G (54)	DRYYYYDGVYWYSDYF DY (55)

	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB37	H C	SYWIS (122)	IYPGDSYTRYSPSFQG (123)	DYEWELFDSRLDY (124)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB344	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB345	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB346	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB347	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB349	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLK G (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRGNWPLT (136)
PSMB358	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLK G (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB359	HC	SDAMH	EISGSGGYTNYADSLK	DSYDSSLYVGDYFDY

		(25)	G (135)	(27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB360	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLK G (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB361	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (136)
PSMB362	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB363	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSM KS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB365	HC	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADSLK S (137)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)

В некоторых вариантах осуществления предлагается PSMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления предлагается PSMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 2, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, PSMA-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с PSMA с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 2, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 84 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 12 и 24 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 147 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 148.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 133 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 147 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29 и 136 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 144.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 146 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 150.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 131, 29 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 139 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 142.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 133 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 146 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 137, 27, 28, 133 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 151 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывает ВКД PSMA человека с равновесной константой диссоциации (K_D) менее около 100 нМ, в некоторых случаях менее около 50 нМ, например менее около 12 нМ, причем K_D измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывает ВКД PSMA яванского макака с равновесной константой диссоциации (K_D) менее около 100 нМ, в некоторых случаях менее около 50 нМ, например менее около 12 нМ, причем K_D измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG4, который в некоторых случаях содержит замену S228P, F234A и L235A в тяжелой цепи по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61 и относится к изотипу IgG4, в некоторых случаях содержащему замены S228P, F234A и L235A по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело PSMA/CD3.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении солидной опухоли.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака предстательной железы или резистентного к кастрации рака предстательной железы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении простатической интраэпителиальной неоплазии.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении колоректального рака.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении светлоклеточного рака почки.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака желудка.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении почечно-клеточной карциномы (ПКК) (например, светлоклеточной почечной карциномы или папиллярно-клеточной почечной карциномы) или ее метастатического поражения.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака мочевого пузыря.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака молочной железы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении рака почки.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении неоваскулярного нарушения, такого как, например, рак, характеризующийся ростом солидной опухоли.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении неоваскулярного нарушения, такого как, например, светлоклеточный рак почки (СПКК), колоректальный рак, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак легкого и рак поджелудочной железы, а также различных других видов рака, отличных от рака предстательной железы, включая, без ограничений, рак почки, рак уротелия, легкого, толстой кишки, молочной железы и аденокарциному печени.

Класс IgG у людей делится на четыре изоформа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетки-мишени, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя антитела с описанными особенностями вариабельных доменов в комбинации с любым из изоформ IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально представлять угрозу безопасности, вызывая токсичность, не связанную с механизмом действия. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования областей Fc для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIIb и/или Fcγ RIIIa; (c) сниженной аффинностью к FcγRI; (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa; (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb; (f) сниженной аффинностью к Fcγ RIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изоформы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изоформ IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изоформ IgG1, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в своей Fc-области. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изоформе IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изоформе IgG4, который в некоторых случаях содержит замену S228P в тяжелой цепи по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изоформе IgG1, необязательно содержащему замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

Наряду с описанными PSMA-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие PSMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками.

Гомологичные антитела

Варианты антител, специфически связывающих PSMA в соответствии с изобретением, описанные в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, содержащие аминокислотные последовательности VH, VL или VH и VL, показанные в табл. 3, входят в объем изобретения. Например, варианты могут содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен в VH и/или VL постольку, поскольку гомологичные антитела сохранили или имеют улучшенные функциональные свойства по сравнению с исходными антителами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VH или VL по изобретению. Необязательно любое изменение варианта по сравнению с исходным антителом не выполняется в рамках CDR варианта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, 160, 138, 139 или 140, причем VH необязательно имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VL с SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 76, 78, 142, 143 или 144, причем VL необязательно имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 68 и VL с SEQ ID NO: 69, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, пере-

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

Гомологичные антитела, специфически связывающие PSMA в соответствии с изобретением, описанные в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления имеют одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) связывает ВКД PSMA Pan troglodytes с равновесной константой диссоциации (K_D) 25 нМ или менее, при этом K_D измеряется с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C,

б) связывает клетки LNCaP с расчетной EC_{50} 20 нМ или менее и связывает клетки HEK, экспрессирующие PSMA Macaca fascicularis, с расчетной EC_{50} 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC_{50} между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток HEK, экспрессирующих PSMA Macaca fascicularis, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC_{50} измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии,

в) связывает рекомбинантный ВКД PSMA человека (SEQ ID NO: 7), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) и Macaca fascicularis (SEQ ID NO: 5) при равновесной константе диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса ProteOn XPR36 при +25°C;

д) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток HEK, экспрессирующих PSMA человека, или клеток HEK, экспрессирующих PSMA Macaca fascicularis, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом CD3B219 к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7 или

е) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 3)

Антитела с консервативными модификациями

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит VH, содержащие последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, которые содержат последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем одна или более из последовательностей CDR содержит установленные аминокислотные последовательности на основании описанных в настоящем документе антител (например, антител, показанных в табл. 2) или их консервативных модификаций, и при этом антитела сохраняют желательные функциональные свойства исходных антител, специфически связывающих PSMA, по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24 и 25 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36 соответственно

торых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 131, 29 и 132 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 131, 29 и 132 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29 и 136 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 131, 29 и 132 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 133 и 132 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 137, 27, 28, 133 и 132 соответственно и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело, специфически связывающее PSMA, в соответствии с изобретением содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123, 124, 23, 12 и 24 соответственно и их консервативные модификации.

Антитела с консервативными модификациями в соответствии с изобретением, описанные в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления имеют одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) связывает ВКД PSMA Pan troglodytes с равновесной константой диссоциации (K_D) 25 нМ или менее, при этом K_D измеряется с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C,

б) связывает клетки LNCaP с расчетной EC_{50} 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие PSMA *Macaca fascicularis*, с расчетной EC_{50} 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC_{50} между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC_{50} измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии,

в) связывается с рекомбинантным ECD PSMA от человека (SEQ ID NO: 7), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) и *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5) при равновесной константе диссоциации (KD) 12 нМ или менее, причем KD измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса ProteOn XPR36 при +25°C;

д) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток НЕК, экспрессирующих PSMA человека, или клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом CD3B219 к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7 или

е) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 3).

Термин "консервативная модификация" относится к модификациям аминокислот, которые не оказывают значимого влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми

цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki et al., (1988) *Adv Biophys* 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4683195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Trp). Характеристики полученных в результате вариантов антител могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Иммуноконъюгаты

Термин "иммуноконъюгат" означает антитело по изобретению, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами.

В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с изобретением, описанное в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, конъюгировано с одним или более цитотоксических агентов. К примерам таких цитотоксических агентов относятся химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) и радиоактивные изотопы.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело изобретения конъюгировано с одним или более лекарственных средств, например с майтанзиноидом (см., например, патенты США № 5,208,020, 5,416,066); ауристатином, например монометилауристатиновыми лекарственными группами DE и DF (ММАЕ и ММАF) (см., например, патенты США № 5,635,483, 5,780,588, и 7,498,298), доластатином, калихеамицином или их производными (см., например, патенты США № 5,712,374, 5,714,586, 5,739, 116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 и 5,877,296; Hinman et al., (1993) *Cancer Res* 53:3336-3342 и Lode et al., (1998) *Cancer Res* 58:2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см., например, Kratz et al., (2006) *Current Med. Chem* 13:477-523; Jeffrey et al., (2006) *Bioorganic & Med Chem Letters* 16:358-362; Torgov et al., (2005) *Bioconj Chem* 16:717-721; Nagy et al., (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:829-834; Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529:-1532 (2002); King et al., (2002) *J Med Chem* 45:4336-4343; и патент США № 6,630,579), метотрексат, виндезин, таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело изобретения, описанное в настоящем документе, конъюгированное ферментативно активным токсином или его фрагментом, таким как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор *omordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, ретриктоцин, феномицин, эномицин и трикотесены.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления антитело конъюгировано с радиоактивным атомом с образованием радиококонъюгата. Для получения радиококонъюгатов существуют разнообразные радиоактивные изотопы. К примерам относятся At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 и радиоактивные изотопы Lu. При использовании для детекции радиококонъюгата, он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например ^{99m}Tc или I123, или спиновую метку для визуализации с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также именуемой магнитно-резонансной томографией, МРТ), например снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела изобретения, описанные в настоящем документе, и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных агентов для соединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминогиолат (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HQ), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как

бис-(*p*-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(*p*-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фторными группами (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ригин можно готовить так, как описано в Vitetta et al., (1987) Science 238: 1098. Меченный углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклида с антителом. См., например, WO94/11026. Линкер может представлять собой "отщепляемый линкер", способствующий высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно применять кислото-неустойчивый линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотолabileный линкер, диметилловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., (1992) Cancer Res 52: 127-131; патент США № 5,208,020).

Иммуноконъюгаты или ADC можно получать с кросс-линкерными реагентами, такими как BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые имеются в продаже (например, от Pierce Biotechnology, Inc., г. Рокфорд, штат Иллинойс, США).

Один вариант осуществления изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой иммуноконъюгат, содержащий антитело, специфически связывающее PSMA в соответствии с изобретением, связанное с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

Другой вариант осуществления изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой иммуноконъюгат, содержащий антитело, специфически связывающее CD3 в соответствии с изобретением, связанное с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

Другой вариант осуществления изобретения и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой иммуноконъюгат, содержащий биспецифическое антитело к PSMA/CD3 в соответствии с изобретением, связанное с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

Создание моноспецифических антител по изобретению

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антагонистические антитела, специфически связывающие PSMA, в соответствии с изобретением являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антагонистические антитела, специфически связывающие PSMA, в соответствии с изобретением являются гуманизированными.

Моноспецифические антитела по изобретению, описанные в настоящем документе (например, антитела, специфически связывающие PSMA), можно создавать с применением разнообразных технологий. Например, для создания моноклональных антител можно применять способ гибридом по Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975. В способе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например, хомяка, крысу или обезьяну, иммунизируют PSMA или CD3 человека шимпанзе или макака либо фрагментами PSMA или CD3, такими как внеклеточные домены PSMA или CD3, с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с применением стандартных способов с образованием клеток гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, подвергают скринингу на основании продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Для получения антител к PSMA в соответствии с изобретением, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно использовать различных животных-хозяев. Например, для получения мышинных антител к человеческому PSMA можно использовать мышей Balb/c. Антитела, полученные от мышей линии Balb/c и от других животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы с применением разнообразных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями.

Примеры методик гуманизации, включающих в себя отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают в себя прививание CDR (патент США № 5,225,539), прививание SDR (патент США № 6,818,749), изменение поверхности (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8,748,356) или супергуманизацию (патент США № 7,709, 226). В этих способах CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения человеческих антител против белка-мишени можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши или крысы, которые описаны, например, в патенте США № 6150584, международной патентной публикации № WO99/45962, международных патентных публикациях № WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036, Lonberg et al (1994) *Nature* 368:856-9; Green et al (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg and Huszar (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93; Bruggemann et al., (1991) *Eur J Immunol* 21:1323-1326; Fishwild et al., (1996) *Nat Biotechnol* 14:845-851; Mendez et al., (1997) *Nat Genet* 15:146-156; Green (1999) *J Immunol Methods* 231:11-23; Yang et al., (1999) *Cancer Res* 59:1236-1243; Bruggemann and Taussig (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разорвать или удалить, и в геном животного можно встроить по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) и Ablexis (http://_www_ablexis_com).

Человеческие антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг сконструирован с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их участков, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные варибельные области антител (Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86; Krebs et al., (2001) *J Immunol Meth* 254:67-84; Vaughan et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets et al., (1998) *PITAS (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter (1991) *J Mol Biol* 227:381; Marks et al., (1991) *J Mol Biol* 222:581). Антитела по изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO 09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с PSMA или CD3 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы; из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG. Такие способы использования фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патенты США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793; 6 521 404; 6 544 731; 6 555 313; 6 582 915 и 6 593 081.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован de novo в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Создание мультиспецифических антител PSMA x CD3 по изобретению

Мультиспецифические антитела PSMA x CD3 по изобретению (например, биспецифические антитела, которые содержат первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3) можно создавать посредством комбинирования связывающих PSMA доменов VH/VL и связывающих CD3 доменов VH/VL, выделенных и охарактеризованных в настоящем документе. Альтернативно биспецифические антитела PSMA x CD3 можно конструировать с применением доменов VH/VL из доступных в открытых источниках моноспецифических антител к PSMA и к CD3 и/или посредством соединения связывающих PSMA или CD3 доменов VH/VL, указанных в настоящем документе, с доступными в открытых источниках связывающими PSMA или CD3 доменами VH/VL.

Примерами антител к PSMA, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к PSMA x CD3, являются, например, антитела, описанные в настоящем документе и в табл. 2. Например, домены VH/VL антител к PSMA изобретения могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие связывающие CD3 домены VH/VL, описанные в настоящем документе и в табл. 5. Например, домены VH/VL антител CD3 CD3B217 и CD3B219, описанных в настоящем документе, можно применять для создания биспецифических антител PSMA x CD3. В дополнение к описанию и характеристике антител CD3B217 и CD3B219, предложенных в данном документе, более подробное описание антител можно найти в опубликованной заявке на патент США № 2016-0068605 A1, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Аналогичным образом, примерами антител к CD3, которые можно применять для конструирования биспецифических молекул PSMA x CD3, являются, например, описанные в международных патентных

публикациях № WO 2005/048935, WO 2004/106380 и WO 2015095392. Эти домены VH/VL CD3 можно встраивать в биспецифические антитела, которые содержат связывающие PSMA домены VH/VL, описанные в настоящем документе и в табл. 2. Например, домены VH/VL антител к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, и PSMB365, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения биспецифических антител к PSMA×CD3.

Созданные биспецифические антитела к PSMA x CD3 можно протестировать на их связывание с PSMA и CD3 и на их желательные функциональные характеристики, такие как опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих PSMA (например, LNCaP).

Биспецифические антитела по изобретению содержат антитела, имеющие полную размерную структуру антитела.

Термин "полноразмерное антитело" означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Тяжелая цепь (HC) полноразмерного антитела состоит из хорошо известных переменных и константных доменов тяжелой цепи VH, CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Полноразмерная легкая цепь антитела (LC) состоит из хорошо известных переменных и константных доменов легкой цепи VL и CL. Полноразмерное антитело может не содержать С-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях.

Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелой цепи - легкой цепи, специфически связывающуюся с антигеном.

Полноразмерные биспецифические антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, введя в поверхность взаимодействия CH3 тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, или *in vitro* в бесклеточной среде, или с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно CH3-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. CH3-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на PSMA и эпитопом на CD3.

Термин "гомодимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности CH3. Термин "гомодимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Термин "гетеродимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности CH3. "Гетеродимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями CH3.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают конструкторы, такие как Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), "выступы во впадины" (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody (Genmab A/S).

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению можно применять технологию Triomab quadroma. Технология Triomab стимулирует обмен Fab-плечами между двумя исходными химерными антителами, одним исходным mAb, имеющим IgG2a, и вторым исходным mAb, имеющим крысиные константные области IgG2b, с получением химерных биспецифических антител.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами CH3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов CH3, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в CH3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене CH3 первой

тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению можно применять технологию CrossMAb. Антитела CrossMAb дополнительно к применению стратегии обмена Fab-плечами в промоторе по типу "выступ во впадину" имеют в одной из половин плеч обмен доменами CH1 и CL для обеспечения правильного объединения в пары легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8,242,247).

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению могут применяться другие стратегии перенаправления посредством обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или внутри тяжелой цепи в биспецифических антителах (либо в одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, CH3 с CL и CH3 с CH1, как описано в патентных публикациях № WO 2009/080254, WO 2009/080251, WO 2009/018386 и WO 2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

Для получения биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию LUZ-Y. В этой технологии к С-концам доменов CH3 присоединяют последовательность типа лейциновой застежки для контроля сборки гетеродимера из исходных мкАт, которую удаляют после очистки, как описано Wranik et al., (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9.

Для получения биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US 20070287170.

В настоящем изобретении также предложены мультиспецифическое, мультифункциональное антитело, которое специфически связывается с PSMA.

В соответствии с изобретением такое мультиспецифическое многофункциональное антитело, которое специфически связывается с PSMA, может представлять собой триспецифическое антитело для двойного нацеливания на опухолевые клетки - это трифункциональные структуры, которые могут быть выполнены с возможностью нацеливания на две различные мишени/эпитопы на опухолевой клетке и с третьей функциональностью связывания с высокой аффинностью либо с Т-клетками, либо с НК-клетками. Триспецифические антитела, нацеленные на два разных эпитопа опухоли и взаимодействующие с Т- или НК-клетками, лизируют опухолевые клетки, которые экспрессируют обе мишени. Такие молекулы могут быть получены с помощью форматов антител, известных в данной области и подробно описанных в настоящем документе. (WO 20151842071, WO 2015158636, WO 2010136172, WO 2013174873). В триспецифическом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий полипептид является биспецифическим к PSMA и второму отдельному антигену на опухолевой клетке и дополнительно специфичным к эффекторной клетке, в частности Т-клетке или НК-клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области CH3 двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746 (DuoBody Technology). В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к PSMA) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD3) конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене CH3, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (DTT), дитиозритритол (DTE),

глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления выделенное биспецифическое антитело, содержащее первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, содержит, по меньшей мере, одну замену в константном домене антитела CH3.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления по меньшей мере одна замена в константном домене антитела CH3 представляет собой замену 409R, F405L или F405L и R409K, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

Домены антитела и нумерация являются хорошо известными. Термин "асимметричный" относится к неидентичным заменам в двух доменах CH3 в двух отдельных тяжелых цепях антитела. Область CH3 IgG1, как правило, состоит из остатков 341-446 на IgG1 (нумерация остатков соответствует каталогу EU).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, выделенное биспецифическое антитело к PSMA x CD3 содержит замену F405L в первой тяжелой цепи (HC1) антитела и замену 409 R во второй тяжелой цепи (HC2) антитела.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, выделенное биспецифическое антитело к PSMA x CD3 содержит замену S228P в HC1 и замены S228P, F405L и R409K в HC2, причем антитело относится к изолипу IgG4.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления HC1 содержит первый домен, специфически связывающий PSMA, а HC2 содержит второй домен, специфически связывающий CD3.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь асимметричных замен в HC1 и HC2 в положениях остатков 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре асимметричных замены в HC1 и HC2 в положениях остатков 350, 370, 405 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну асимметричную замену в HC1 и HC2 в положениях остатков 405 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит замену 409R или F405L в HC1 и замену 409R или F405L в HC2, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело изобретения содержит замену F405L в HC1 и замену 409 R в HC2.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну асимметричную замену в HC1 и HC2 в положениях остатков 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 409 в HC1 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met, а в положении 405 в HC2 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 405 в HC1 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, а в положении 409 в HC2 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 409 в HC1 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met, а в положении 405 в HC2 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, Arg или Gly.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 405 в HC1 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, Arg или Gly, а в положении 409 в HC2 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а HC2 содержит аминокислоту, отличную от Phe, в положении 405 и содержит Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 имеет аминокис-

Как правило, замены вводят в молекулу, например, в константный домен антитела, на уровне ДНК с помощью стандартных способов.

Антитела по изобретению могут быть сконструированы в виде разнообразных известных форм антител.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой диателом (англ.: diabody) или кросс-тело (англ.: cross-body).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, причем каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием включают молекулы (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis), антитело "два в одном" (Genentech) и mAb2 (F-Star).

В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают молекулы (DVD)-Ig с двойным переменным доменом (Abbott), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

В некоторых вариантах осуществления Fc-слитые молекулы включают слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), "двойного действия" или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают биспецифический T-клеточный активатор (BITE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), гибриды ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), и COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь. Были описаны разные форматы биспецифических антител, например, в публикации Chames and Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276 и Nunez-Prado et al., (2015) *Drug Discovery Today* 20(5):588-594.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

Также описываются выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с PSMA. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты переменных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

PSMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных PSMA-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Если конкретный аминокислотный остаток может варьироваться в разных изоформах или вариантах пептидов, и замена влияет на этот остаток в каждом изоформе или варианте или в любом из изоформов или вариантов, замена обозначается как, например, 409 R, что означает, что аминокислота, соответствующая положению 409, замещена аргинином. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более аминокислотных

остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливается с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

PSMA-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1 или IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующей терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов:

гипоксантинофосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна - Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность PSMA-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента находится под контролем индуци-

бельного промотора, например, промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более интерферон-стимулируемых реагирующих элементов (ISRE), промоторов протеинкиназы R 2',5'-олигоденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т.п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриноклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих PSMA-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, в другом аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с PSMA, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примерами в настоящем документе.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т.п. (описано в публикации Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, приемлемым для применения в экспрессии PSMA-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO-K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и т.п. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Фармацевтические композиции/введение

В изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможна подготовка антител по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-ный солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т.д. Концентрация антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20% вес, и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Способом введения для терапевтического применения антител по изобретению может служить любой приемлемый путь доставки антитела в организм-хозяин, такой как парентеральное введение, например, внутрисуставное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное или подкожное, легочное, чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), в виде состава в таблетке, капсуле, растворе, порошке, геле, частице; и введение антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством доставки в опухоль, сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно вводить субъекту любым подходящим путем, например, парентерально путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутривенно. Внутривенная инфузия может продолжаться, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая субъекту, является достаточной для ослабления или, по меньшей мере, частичного торможения заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 мг до около 100 мг/кг, например, от около 0,05 мг до около 30 мг/кг, или от около 5 мг до около 25 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например, 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения пациенту обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител в соответствии с изобретением, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Кроме того, возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. При повторном введении можно вводить такую же дозу или другую дозу. Например, описанные в данном документе антитела по изобретению можно вводить в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Например, антитела в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых ва-

риантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно вводить в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, в, по меньшей мере, одни из суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, или альтернативно в, по меньшей мере, одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения, или в любой их комбинации с применением однократной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или в любой их комбинации.

Антитела в способах изобретения, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, отложить начало возникновения события в ходе прогрессирования рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака.

Антитела по изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в приемлемом носителе перед применением. Была доказана эффективность этого метода для стандартных белковых препаратов, с ним также можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Способы применения PSMA-специфических антител

PSMA представляет собой связанный с раком предстательной железы клеточный мембранный антиген, часто сверхэкспрессируемый при простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН), то есть состоянии, при котором некоторые клетки предстательной железы начинают выглядеть и вести себя ненормально; первичном и метастатическом раке предстательной железы; и в новообразованных сосудах других солидных опухолей (например, молочной железы, легких, мочевого пузыря, почек). Уровни экспрессии PSMA коррелируют с прогрессированием заболевания и количеством баллов по шкале Глисона. Экспрессия PSMA увеличивается при метастатическом заболевании, гормонально-рефрактерных случаях и поражениях более высокой степени и дополнительно усиливается при нечувствительных к андрогенам опухолях.

Блокада PSMA может ингибировать или уменьшать рост PSMA-экспрессирующих раковых клеток и опухолей у субъекта. Он также может обладать антиангиогенной активностью благодаря экспрессии PSMA в новообразованных сосудах опухоли (Milowsky, et al. 2007). PSMA высоко экспрессируется при простатической интраэпителиальной неоплазии, наиболее развитом предшественнике карциномы предстательной железы, и, следовательно, блокада PSMA может модулировать прогрессирование ПИН к раку предстательной железы.

Один вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с изобретением, специфически связывающего PSMA.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования образования или роста новообразованных сосудов опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, специфически связывающего PSMA, в соответствии с изобретением.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования прогрессирования предракового состояния у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела по изобретению, специфически связывающего PSMA.

В другом варианте осуществления изобретения, описанном в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления предлагается способ лечения рака введением требующему этого субъекту антитела по изобретению, специфически связывающего PSMA, описанного в настоящем документе.

Один вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, специфически связывающего PSMA x CD3, по изобретению.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования образования или роста новообразованных сосудов опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, специфически связывающего PSMA x CD3, в соответствии с изобретением.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный в настоящем документе, и в некоторых ва-

риантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления представляет собой способ ингибирования прогрессирования предракового состояния у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела по изобретению, специфически связывающего PSMA x CD3.

В другом варианте осуществления изобретения, описанном в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления из всех без исключения перечисленных ниже пронумерованных вариантов осуществления предлагается способ лечения рака введением требующему этого субъекту биспецифического антитела по изобретению, специфически связывающего PSMA x CD3 в соответствии с изобретением.

Примерами антител, которые можно применять в способах по изобретению, являются антитела, специфически связывающие PSMA и биспецифические антитела к PSMA x CD3, как описано в настоящем документе.

Примерами антител к PSMA, которые могут быть моноспецифическими или могут быть частью биспецифических антител к CD3, являются антитела PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363 и PSMB365, имеющего аминокислотную последовательность VH и VL и характеристики, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления антителом, специфически связывающим PSMA и применяемым в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, является PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363 и PSMB365. Аминокислотные последовательности VH и VL этих антител показаны в табл. 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 79 и VL с SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 72 и VL с SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 68 и VL с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 70 и VL с SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее PSMA и применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 138 и VL с SEQ ID NO: 67.

применяемое в способах по изобретению, описанных в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65 в первом домене, а также VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105 во втором домене.

Рак может представлять собой гиперпролиферативное состояние или расстройство, солидную опухоль, новообразованные сосуды, опухоль мягкой ткани или метастатическое поражение.

Предполагается, что термин "рак" включает в себя все типы раковых разрастаний или онкогенных процессов, метастазирования в тканях или злокачественной трансформации клеток, тканей или органов независимо от типа гистопатологии или стадии инвазивности. Примеры рака включают в себя солидные опухоли, гематологические злокачественные опухоли, опухоли мягких тканей и метастатические поражения. Примеры солидных опухолей включают в себя злокачественные образования, например, саркомы, и карциномы (включая аденокарциномы и плоскоклеточные карциномы) в различных системах органов, такие как поражения предстательной железы, печени, легкого, молочной железы, лимфатической системы, желудочно-кишечного (например, толстая кишка) и мочеполового трактов (например, почки, уротелиальные клетки), предстательной железы и глотки. Аденокарциномы включают в себя злокачественные образования, такие как многие виды рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточная карцинома, рак печени, немелкоклеточная карцинома легкого, рак тонкого кишечника и рак пищевода. Плоскоклеточные карциномы включают в себя злокачественные образования, например, в легком, пищеводе, коже, в области головы и шеи, ротовой полости, анусе и шейке матки.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы.

Метастатические поражения упомянутых выше видов рака можно также лечить или предотвращать с помощью способов и антител по изобретению, описанных в настоящем документе.

Примеры видов рака, рост которых можно ингибировать или уменьшать с помощью антител по изобретению, описанному в настоящем документе, включают в себя виды рака, которые могут сверхэкспрессировать PSMA. Примеры видов рака включают рак предстательной железы, или простатическую интраэпителиальную неоплазию, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы и другие виды рака, отличные от рака предстательной железы, включая, без ограничений, рак почки, рак уротелия и аденокарциному печени. Устойчивые или рецидивирующие злокачественные образования можно лечить с помощью антител по изобретению, описанных в настоящем документе.

Примерами других видов рака, которые можно лечить антителами по изобретению, описанному в настоящем документе, являются рак ануса, базально-клеточная карцинома, рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак мозга и ЦНС, карцинома фаллопиевых труб, карцинома влагалища, карцинома вульвы, злокачественная меланома кожи или глаза, астроцитомный рак пищевода, рак яичка, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак матки, первичная лимфома ЦНС; опухоль центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарцинома, рак прямой кишки, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак глаза; внутриэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, рак печени; мелкоклеточный рак легкого, нейробластома, рак ротовой полости (например, губы, языка, рта и глотки), рак носоглотки, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак дыхательной системы, саркома, рак щитовидной железы, рак мочевой системы, гепатокарцинома, рак анальной области, карцинома фаллопиевых труб, карцинома влагалища, карцинома вульвы, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли у детей, опухолевый ангиогенез, рак спинного мозга, глиома мозгового ствола, аденома гипофиза, саркома Капоши, рак меркелевых клеток, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, вида рака, индуцированного окружающей средой, включая рак, индуцированный асбестом, и другие карциномы и саркомы, а также комбинации указанных видов рака.

Пациентов, имеющих рак, включая метастатический рак, который экспрессирует PSMA, можно лечить антителами по изобретению, описанному в настоящем документе. Рак может представлять собой рак предстательной железы, или простатическую интраэпителиальную неоплазию, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы и другие виды рака, отличные от рака предстательной железы, включая, без ограничений, рак почки, рак уротелия и аденокарциному печени.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, у субъекта имеется солидная опухоль.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, у субъекта имеется бластома предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, у солидная опухоль представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой плоскоклеточный рак.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, рак представляет собой светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой глиому.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы или резистентный к кастрации рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак почки.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой аденокарциному печени.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, рак представляет собой неоваскулярное нарушение.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, рак представляет собой рак почки.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак уротелия.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, солидная опухоль представляет собой рак головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, субъект имеет опухоль, которая экспрессирует PSMA.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, субъект имеет инфильтрированные в опухоль Т-лимфоциты (TIL) в опухолевой ткани.

Термин "увеличение числа" относится к статистически значимому увеличению у субъекта по сравнению с контролем. "Увеличение числа", например, относится к статистически значимому увеличению числа TIL у субъекта (например, пациента) до и после лечения антителом PSMA или другим терапевтическим средством.

В некоторых вариантах, описанных в настоящем документе, осуществления субъект имеет повышенную экспрессию или активность интерферона-гамма (ИФН- γ).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, субъект получал лечение антителом к PSMA.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, субъект устойчив к лечению антителом к PSMA.

Любое из антител PSMA или биспецифических антител PSMA x CD3 по изобретению, описанных в настоящем документе, может применяться в способах по изобретению.

Антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно, в одном варианте осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления другой терапевтический агент представляет собой радиофармацевтический агент (такой как хлорид радия-223), вторичные гормональные терапевтические средства (такие как абиратерон или энзалутамид) и/или химиотерапевтические средства (доцетаксел и кабазитаксел). Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным, в любом порядке. Для одновременного введения агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, соответственно, химиотерапевтический агент (например, доцетаксел, карбоплатин, флударабин), абиратерон, гормональную терапию (например, флутамид, бикалутамид, нилутамид, ципротерона ацетат, кетоконазол, аминоклутетимид, абареликс, дегареликс, лейпролид, гозерелин, трипторелин, бусерелин, ARN-509), ингибитор сериновой или тирозинкиназы (например, ингибитор PI3-киназы SF1126), (например, лапатаниб), ингибитор множественной киназы (например, сорафениб, сунитиниб), ингибитор VEGF (например, бевацизумаб), TAK-700, вакцина против рака (например, ВРХ-101, РЕР223), вакцина на основе листерия, леналидомид, ТОК-001, ингибитор рецептора IGF-1 (например, циксумумаб), TRC105, ингибитор киназы Аурога А (например, MLN8237), ингибитор протеасом (например, бортезомиб), ОГХ-011, радиоиммунотерапия (например, NuJ591-GS), ингибитора HDAC (например, вальпроевая кислота, SB939, LBH589), гидроксихлорохина, ингибитора mTOR (например, эверолимуса), довитиниба лактата, дииндоллилметана, эфавиренза, ОГХ-427, генистеина, ИМС-3G3, бафетиниба, СР-675,206, лучевой терапии, хирургического вмешательства или их комбинации.

В одном варианте осуществления предлагается способ лечения расстройства у субъекта с вовлечением клеток, экспрессирующих ВСМА, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела или фрагмента, например биспецифического антитела к ВСМА x CD3, описанного в настоящем документе, и проведение лучевой терапии. В одном варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения рака, причем способ включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела или фрагмента, например антитела к ВСМА x CD3, описанного в настоящем документе, и проведение лучевой терапии. Предлагается лучевая терапия, которая может включать облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечение пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иод-123, иод-131 и индий-111.

Антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации с вакциной.

Примерами вакцин являются иммуногенные агенты, такие как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, эпитопы антигена, пептиды и молекулы углеводов), опухолевые антигены, доставляемые пациенту посредством генной терапии, клеток и трансфицированные генами клетки, кодирующие стимулирующие иммунитет цитокины. Примеры вакцин, которые можно применять, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF, вакцины на основе ДНК, вакцины на основе листерия, вакцины на основе РНК и вакцины на основе вирусной трансдукции, пептиды, или антигены предстательной железы (например, PSMA, STEAP1, PSCA), противораковая вакцина сипулейцел-Т или пептиды антигенов рака легкого. Вакцина против рака может быть профилактической или терапевтической.

Были разработаны многие экспериментальные стратегии вакцинации против опухолей (см. Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В одной из этих стратегий вакцину готовят с применением аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Как показано, эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансфицированы для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является мощным активатором презентации антигена для вакцинации к опухоли (Dranoff et al., (1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90: 3539-43.).

Антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации с одним или набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли или на ней, чтобы вызвать иммунный ответ на эти белки. Иммунная система обычно принимает эти белки как аутоантигены и поэтому толерантна к ним. Опухолевый антиген может также включать в себя белок теломеразы, который требуется для синтеза теломер хромосом и который экспрессирован при более чем 85%

видов рака у человека, но лишь в ограниченном числе соматических тканей (Kim et al., (1994) Science 266: 2011-2013). Опухолевые антигены могут также представлять собой "неоантигены", экспрессированные в раковых клетках или на них в результате соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают гибридные белки из двух неродственных последовательностей (например, bcr-abl в хромосоме Philadelphia) или идиотипы из В-клеточных опухолей. Опухолевые антигены могут представлять собой антигенные эпитопы простат-специфического антигена (PSA), мезотелина, простат-специфического мембранного антигена (PSMA), синовиальной саркомы X2 (SSX2), NKX3.1, кислой фосфатазы простаты (PAP) или рецепторов фактора роста эпидермиса либо пептиды, специфические для вариантов EGFR, такие как известный EGFRvIII, сверхэкспрессированный на опухолевых клетках.

Другие вакцины против опухоли могут включать в себя белки из вирусов, участвующих в раковых заболеваниях человека, таких как вирусы папилломы человека (ВПЧ), вирусы гепатита (ВГВ и ВГС), герпес саркомы Капоши (KHSV) и вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ). Другую форму специфических опухолевых антигенов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению, описанными в настоящем документе, представляют собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. HSP содержат фрагменты белков из опухолевых клеток и проявляют высокую эффективность при доставке в антигенпрезентирующие клетки для возбуждения иммунитета против опухоли (Suot and Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al., (1997) Science 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) являются мощными антигенпрезентирующими клетками, которые можно применять для затравки специфических ответов на антиген. DC можно получить *ex vivo* и нагрузить различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al., (1998) Nature Medicine 4: 328-332). DC можно также трансформировать генетическими средствами для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также сливали непосредственно с опухолевыми клетками в целях иммунизации (Kugler et al., (2000) Nature Medicine 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с антителами по изобретению, описанными в настоящем документе, для активации более мощных ответов против опухолей.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела, специфически связывающие PSMA, по изобретению или биспецифические антитела PSMA x CD3 по изобретению вводят в комбинации с вакциной против опухоли, которая содержит фрагмент пептида простат-специфического антигена либо вектор, кодирующий фрагмент пептида простат-специфического антигена.

Антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации со стандартным лечением рака.

Антитела по изобретению, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации со стандартными курсами химиотерапевтического лечения рака. В этих случаях возможно уменьшение дозы вводимого химиотерапевтического агента (Mokyr et al., (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению можно вводить в комбинации с одной или более из других молекул антител, химиотерапии, другой противораковой терапии (например, таргетной противораковой терапии или онколитических лекарственных средств), цитотоксических агентов, цитокинов, хирургических и/или радиационных процедур.

Примеры цитотоксических агентов, которые можно вводить в комбинации с антителами по изобретению, описанному в настоящем документе, включают в себя ингибиторы гормонов, антимикротубулиновые агенты, ингибиторы топоизомеразы, антиметаболиты, ингибиторы митоза, алкилирующие агенты, антрациклины, алкалоиды барвинка, агенты интеркаляции, агенты, способные помешать на сигнальном пути трансдукции, агенты, способствующие апоптозу, ингибиторы протеасом и облучение (например, местное или общее облучение организма).

Стандартные терапевтические агенты включают в себя анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицина сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан для инъекций (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозина арабинозид (Cytosar-U®), липосомы цитарабина для инъекций (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Actinomycin D, Cosmegen), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), липосомы даунорубицина цитрата для инъекций (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабина фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксцитидин), гидроксимочевина (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназа (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), паклитаксел (Taxol®), феникс (иттрий-90/MX-DTPA), пентостатин, имплантат полифепросан-20 с кармустином (Gliadel®), тамоксифена цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепал, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекций (Nuscampin®), винбластин (Velban®), винкрестин (Oncovin®), винорелбин (Navelbine®), ибрутиниб, идеалисиб и брентуксимаб ведотин.

Примеры алкилирующих агентов включают в себя производные горчичного газа, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены: горчичный урацил (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil Nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), хлорметин (Mustargen®), циклофосфамид (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид (Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилендиофосфорамин, темозоломид (Temodar®), тиотепа (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (SeeNU®) и стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные примеры алкилирующих агентов включают оксалиплатин (Eloxatin®); Темозоломид (Temodar® и Temodal®); Дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); Мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и мелфалан, Alkeran®); Алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (СММ), Гексален®); Кармустин (BiCNU®); Бендамустин (Treanda®); Бусульфан (Busulfex® и Myleran®); Карбоплатин (Paraplatin®); Ломустин (также известный как CCNU, SeeNU®); Цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); Хлорамбуцил (Leukeran®); Циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); Дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); Алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (СММ), Гексален®); Ифосфамид (Ifex®); Преднимустин; Прокарбазин (Matulane®); Мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мустин и мехлорэтамину гидрохлорид, Mustargen®); Стрептозоцин (Zanosar®); Тиотепа (также известная как тиофосфоамид, TESPА и TSPA, Thioplex®); Циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); и бендамустина гидрохлорид (Treanda®).

Примеры антрациклинов включают в себя, например, доксорубин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Lenoxane®); даунорубин (даунорубин гидрохлорид, дауномицин и рубидомицин гидрохлорид, Cerubidine®); даунорубин липосомный (липосомы даунорубина цитрата, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубин (Ellence™); идарубин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин С (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин; и дезацетилравидомицин.

Примеры алкалоидов барвинка, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению, включают в себя винорелбина тартрат (Navelbine®), винкристин (Oncovin®) и виндезин (Eldisine®); винбластин (также известный как винбластин сульфат, винкалейкеобластин и VLB, Alkaban-AQ® и Velban®); и винорелбин (Navelbine®).

Примерами ингибиторов протеасом, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению, являются бортезомиб (Velcade®); карфилзомиб (PX-171-007, (S)-4-метил-N-((S)-1-((S)-4-метил-1-((R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксипентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолиноацетиамидо)-4-фенилбутанамидо)-пентанамид); маризомиб (NPI-0052); иксазомиба цитрат (MFN-9708); деланзомиб (SEP-18770); и O-метил-N-[(2-метил-5-тиазолил)карбонил]-L-серил-O-метил-N-[(1S)-2-[(2R)-2-метил-2-оксиранил]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серинамида (ONX-0912).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором серина или тирозинкиназы (например, ингибитором рецептора тирозинкиназы (RTK)). Примеры ингибиторов тирозинкиназы включают в себя ингибитор пути фактора роста эпидермиса (EGF) (например, ингибитор рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR)), ингибитор пути фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, ингибитор рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) (например, ингибитор VEGFR-1, ингибитор VEGFR-2, ингибитор VEGFR-3)), ингибитор пути фактора роста из тромбоцитов (PDGF) (например, ингибитор рецептора фактора роста из тромбоцитов (PDGFR) (например, ингибитор PDGFR-β)), ингибитор RAF-1, ингибитор KIT и ингибитор RET. В некоторых вариантах осуществления вторым терапевтическим агентом является акситиниб (AG013736), бозутиниб (SKI-606), цедираниб (RECENTIN™, AZD2171), дасатиниб (SPRYCEL®, BMS-354825), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA®), иматиниб (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), лапатиниб (TYKERB®, TYVERB®), лестауртиниб (SEP-701), нератиниб (HKI-272), нилотиниб (TASIGNA®), семаксиниб (семаксиниб, SU5416), сунитиниб (SUTENT®, SU11248), тоцераниб (PALLADIA®), вадетаниб (ZACTIMA®, ZD6474), ваталаниб (PTK787, PTK/ZK), трастузумаб (HERCEPTIN®), бевацизумаб (AVASTIN®), ритуксимаб (RITUXAN®), цетуксимаб (ERBITUX®), панитумумаб (VECTIBIX®), ранибизумаб (Lucentis®), нилотиниб (TASIGNA®), сорафениб (NEXAVAR®), алемтузумаб (CAMPATH®), гемтузумаб озогамин (MYLOTARG®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, довитиниба лактат (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, АВТ-869, МР470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, SEP-11981, тивозаниб (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, XL228, АЕЕ788, AG-490, AST-6, BMS-599626, CUDC-101, PD153035, пелитиниб (ЕКВ-569), вадетаниб (зактима), WZ3146, WZ4002, WZ8040, АВТ-869 (линифаниб), АЕЕ788, AP24534 (понатиниб), AV-951 (тивозаниб), акситиниб, ВАУ 73-4506 (регорафениб), бриваниба аланинат (BMS-582664), бриваниб (BMS-540215),

цедираниб (AZD2171), CHIR-258 (довитиниб), CP 673451, CYC116, E7080, Ki8751, мазитиниб (AB1010), MGCD-265, мотезаниба дифосфат (AMG-706), MP-470, OSI-930, пазопаниба гидрохлорид, PD173074, сорафениба тозилат (Bay 43-9006), SU 5402, TSU-68 (SU6668), ваниб, XL880 (GSK1363089, EXEL-2880). Выбранные ингибиторы тирозинкиназы выбирают из сунитиниба, эрлотиниба, гефитиниба или сорафениба. В некоторых вариантах осуществления ингибитором EGFR является биспецифическое антитело EGFRc-Met (EM-1 mAb), содержащее тяжелую и легкую цепи с SEQ ID NO: 249, 250, 251 и 252 (US2014/0141000).

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибиторами рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), включая бевацизумаб (Avastin®), акситиниб (Inlyta®); Бриваниба аланинат (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-фтор-2-метил-1H-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)2-аминопропаноат); Сорафениб (Nexavar®); Пазопаниб (Votrient®); Сунитиниб малат (Sutent®); Цедираниб (AZD2171, CAS 288383-20-1); Варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Форетиниб (GSK1363089); Телатиниб (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); Апатиниб (YN968D1, CAS 811803-05-1); Иматиниб (Gleevec®); Понатиниб (AP24534, CAS 943319-70-8); Тивозаниб (AV951, CAS 475108-18-0); Регорафениб (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); Ваталаниба дигидрохлорид (PTK787, CAS 212141-51-0); Бриваниб (BMS-540215, CAS 649735-46-6); Вандетаниб (Caprelsa® или AZD6474); Мотесаниба дифосфат (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-дигидро-3,3-диметил-1H-индол-6-ил)-2-[(4-пиридинилметил)амино]-3-пиридинкарбоксамид, описанный в публикации PCT No WO 02/066470); Довитиниб димолочная кислота (TKI258, CAS 852433-84-2); Линифаниб (ABT869, CAS 796967-16-3); Кабозантиниб (XL184, CAS 849217-68-1); Лестауртиниб (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-диметилэтил)-2-оксазолил]метил]тио]-2-тиазолил]-4-пиперидинкарбоксамид (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-амино-1-((4-(3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метилпиперидин-3-ол (BMS690514); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[[3α, 5β, 6α]октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); 4-метил-3-[[1-метил-6-(3-пиридинил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил]амино]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (BHG712, CAS 940310-85-0); и афлиберцепт (Eylea®).

Примеры ингибиторов VEGF включают в себя моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело к VEGF A4.6.1, продуцируемое гибридомой ATCC HB 10709; рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело к VEGF, созданное в соответствии с Presta et al., (1997) Cancer Res 57:4593-4599. В одном варианте осуществления антитело к VEGF представляет собой бевацизумаб (BV), также известный как ρ hMAb VEGF или AVASTIN®. Он содержит мутированные каркасные области человеческого IgG1 и антигенсвязывающие области, определяющие комплементарность, из мышинового моноклонального антитела к hVEGF (A.4.6.1), которое блокирует связывание человеческого VEGF с его рецепторами. Бевацизумаб и другие гуманизованные антитела к VEGF дополнительно описаны в патенте США № 6 884 879. Дополнительные антитела к VEGF включают в себя антитела серии G6 или B20 (например, G6-31, B20-4.1), как описано в международных патентных публикациях №№ WO 2005/012359 и WO 2005/044853. дополнительные антитела см. патенты США №№ 7 060 269, 6 582 959, 6 703 020, 6 054 297, WO 98/45332, WO 96/30046, WO 94/10202, EP 0666868B1, опубликованные заявки на патент США №№ US 2006009360, US 20050186208, US 20030206899, US 20030190317, US 20030203409 и US 20050112126; и в публикации Popkov et al., (2004) Journal of Immunological Methods 288: 149-164. Другие антитела включают антитела, которые связываются с функциональным эпитопом на VEGF человека, содержащим остатки F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, 191, K101, E103 и C104, или альтернативно содержащие остатки F17, Y21, Q22, Y25, D63, 183 и Q89.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором PI3K. В одном варианте осуществления ингибитор PI3K представляет собой ингибитор дельта- и гамма-изоформ PI3K. В одном варианте осуществления ингибитор PI3K представляет собой ингибитор бета-изоформ PI3K. Примеры ингибиторов PI3K, которые можно применять, описаны, например, в WO 2010/036380, WO 2010/006086, WO 09/114870, WO 05/113556, GSK 2126458, GDC-0980, GDC-0941, Sanofi XL147, XL756, XL147, PF-46915032, BKM 120, CAL-101, CAL 263, SF1126, PX-886, и ингибитор двойного PI3K (например, Novartis BEZ235).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором mTOR, например, одним или более ингибиторами mTOR, которые выбирают из одного или более из рапамицина, темсиролимуса (TORISEL®), AZD8055, BEZ235, BGT226, XL765, PF-4691502, GDC0980, SF1126, OSI-027, GSK1059615, KU-0063794, WYE-354, Palomid 529 (P529), PF-04691502, или PKI-587, ридафоролимуса (ранее известного как деферолимус, (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2 [(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.04,9]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексила диметилфосфинат, также известного как AP23573 и MK8669 и описанного в публикации PCT № WO 03/064383); эверолимуса (Afinitor® или RAD001); рапамицина (AY22989, Sirolimus®); симапимода (CAS 164301-51-3); эмсиролимуса, (5-{2,4-бис-[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]-пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-

метоксифенил)метанола (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4); и N2-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]-бутил]-L-аргинилглицил-L- α -аспартил-L-серина (SEQ ID NO: 237), внутренней соли (SF1126, CAS 936487-67-1) и XL765.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором BRAF, например, GSK2118436, RG7204, PLX4032, GDC-0879, PLX4720 и сорафениба тозилат (Bay 43-9006).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с иммуномодулирующим агентом. Нацеливание на иммунные контрольные точки, такие как белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), лиганд 1 запрограммированной гибели клеток 1 (PDL1) и антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4), позволило достичь заслуживающего внимания эффекта при множестве видов рака посредством блокирования иммуоингибирующих сигналов и обеспечения для пациентов эффективного противоопухолевого ответа. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению вводят в комбинации с антителом к PD1 (например, ниволумаб) и антителом к PDL (например, MDX-1105) или антителом к CTLA4 (например, Ипилимумаб). Способность агонистических антител к CD40 (называемых α CD40) или лиганда CD40 к стимулированию иммунных ответов и целевых опухолей указывает на то, что такие реагенты перспективны в качестве противораковых иммунотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению вводят в комбинации с антителом к CD40 (например, SGN-40, CP-870,893) или антителом к CD40L (например, BG9588).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором ВТК.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению, вводимые в комбинации с ингибитором MEK, применяют в лечении рака предстательной железы, меланомы, колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, гематологической злокачественной опухоли или почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань или раковая клетка имеет мутацию BRAF (например, мутацию BRAF V600 E), мутацию BRAF дикого типа, KRAS дикого типа или активирующую мутацию KRAS. Рак может находиться на ранней, промежуточной или поздней стадии. В комбинации можно использовать любой ингибитор MEK, включая ARRY-142886, G02442104 (также известный как GSK1120212), RDEA436, RDEA119/BAY 869766, AS703026, G00039805 (также известный как AZD-6244 или селуметиниб), BIX 02188, BIX 02189, CI-1040 (PD-184352), PD0325901, PD98059, U0126, GDC-0973 (метанол, [3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]фенил][3-гидрокси-3-(25)-2-пиперидинил-1-азетидинил]-), G-38963, G02443714 (также известный как AS703206), или их фармацевтически приемлемую соль или сольват. Дополнительные примеры ингибиторов MEK описаны в WO 2013/019906, WO 03/077914, WO 2005/121142, WO 2007/04415, WO 2008/024725 и WO 2009/085983.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с ингибитором JAK2, например, CEP-701, INCB18424, CP-690550 (тасоцитиниб).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с паклитакселом или агентом паклитаксела, например, с TAXOL®, со связанным с белком паклитакселом (например, ABRAXANE®). Примеры агентов паклитаксела включают в себя наночастицы связанного с альбумином паклитаксела (ABRAXANE, продается компанией Abraxis Bioscience), связанный с докозагексаеновой кислотой паклитаксел (ДГК-паклитаксел, Тахоргекин, продается компанией Protarga), связанный с полиглутаматом паклитаксел (PG-паклитаксел, паклитаксел полиглукс, СТ-2103, XYOTAX, продается компанией Cell Therapeutic), активируемое опухолью пролекарство (TAP), ANG105 (Angiorep-2, связанный с тремя молекулами паклитаксела, продается компанией ImmunoGen), паклитаксел-ЕС-1 (паклитаксел, связанный с erbB2-распознающим пептидом ЕС-1; см. Li et al., *Biopolymers* (2007) 87:225-230) и конъюгированный с глюкозой паклитаксел (например, 2'-паклитаксел метил-2-глюкопиранозилсукцинат, см. Liu et al., (2007) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17:617-620).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению вводят в комбинации с клеточной иммунотерапией (например, Provenge (например, Sipuleucel)) и необязательно в комбинации с циклофосфамидом.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения рака предстательной железы, включают химиотерапевтический агент (например, доцетаксел, карбоплатин, флударабин), абиратерон, гормональную терапию (например, флутамид, бикалутамид, нилутамид, ципротерона ацетат, кетоконазол, аминоклутетимид, абареликс, дегареликс, лейп-ролид, гозерелин, трипторелин, бусерелин), ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор двойной киназы (например, лапатаниб), ингибитор множественной киназы (например, сорафениб, сунитиниб), ингибитор VEGF (например, бевацизумаб), TAK-700, вакцину против рака (например, BРХ-101,

PER223), леналидомид, ТОК-001, ингибитор рецептора IGF-1 (например, циксумумаб), TRC105, ингибитор киназы Аурога А (например, MLN8237), ингибитор протеосом (например, бортезомиб), OGX-011, радиоиммунотерапию (например, HuJ591-GS), ингибитор HDAC (например, вальпроевая кислота, SB939, LBH589), гидроксихлорохин, ингибитор mTOR (например, эверолимус), довитиниба лактат, диндоллметан, эфавиренз, OGX-427, генистеин, ИМС-3G3, бафетиниб, CP-675,206, ARN-509, лучевую терапию, хирургическое вмешательство или их комбинацию.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения рака поджелудочной железы, включают себя химиотерапевтический агент, например, паклитаксел или агент паклитаксела (например, композицию паклитаксела, такую как TAXOL, стабилизированную альбумином композицию наночастиц паклитаксела (например, ABRAXANE) или липосомную композицию паклитаксела); гемцитабин (например, гемцитабин отдельно или в комбинации с AXP107-11); другие химиотерапевтические агенты, такие как оксалиплатин, 5-фторурацил, капецитабин, рубитекан, эпирубицин-гидрохлорид, NC-6004, цисплатин, доцетаксел (например, TAXOTERE), митомицин С, ифосфамид; интерферон; ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (например, эрлотиниб, панитумумаб, цетуксимаб, нимотузумаб)); ингибитор рецептора HER2/neu (например, трастузумаб); ингибитор двойной киназы (например, бозутиниб, саракатиниб, лапатиниб, вандетаниб); ингибитор множественной киназы (например, сорафениб, сунитиниб, XL184, пазопаниб); ингибитор VEGF (например, бевацизумаб, AV-951, бриваниб); радиоиммунотерапию (например, XR303); вакцину против рака (например, GVAX, пептид сурвивин); ингибитор COX-2 (например, целекоксиб); ингибитор рецептора IGF-1 (например, AMG 479, МК-0646); ингибитор mTOR (например, эверолимус, темсиролимус); ингибитор IL-6 (например, CNTO 328); ингибитор циклин-зависимой киназы (например, P276-00, UCN-01); соединение, направленное на изменение энергетического метаболизма (AEMD) (например, CPI-613); ингибитор HDAC (например, вориностат); агонист рецептора-2 к TRAIL (TR-2) (например, конатумумаб); ингибитор MEK (например, AS703026, селуметиниб, GSK1120212); ингибитор двойной киназы Raf/MEK (например, RO5126766); ингибитор сигнального каскада (например, МК0752); гибридный белок моноклонального антитела к антителу (например, L19IL2); куркумин; ингибитор HSP90 (например, танеспимицин, STA-9090); rIL-2; денилейкин дифтитокс; ингибитор топоизомеразы I (например, иринотекан, PER02); статины (например, симвастатин); ингибитор фактора VIIa (например, PCI-27483); ингибитор АКТ (например, RX-0201); активируемое гипоксией пролекарство (например, TH-302); метформина гидрохлорид, ингибитор гамма-секретазы (например, R04929097); ингибитор рибонуклеотид-редуктазы (например, 3-AP); иммунотоксин (например, HuC242-DM4); ингибитор PARP (например, KU-0059436, велипариб); ингибитор CTLA-4 (например, CP-675,206, ипилимумаб); терапия AdV-tk; ингибитор протеосом (например, бортезомиб (Велкейд), NPI-0052); тиазолидиндион (например, пиоглитазон); NPC-1C; ингибитор киназы Аурога (например, R763/AS703569), ингибитор CTGF (например, FG-3019); siG12D LODER; и лучевая терапия (например, томотерапия, стереотаксическая лучевая терапия, протонная терапия), хирургическое вмешательство и их комбинация. В определенных вариантах осуществления с антителами по изобретению можно применять комбинацию паклитаксела или агента паклитаксела с гемцитабином.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения мелкоклеточного рака легкого, включают в себя химиотерапевтический агент, например, этопозид, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, иринотекан, топотекан, гемцитабин, липосомный SN-38, бендамустин, темозоломид, белотекан, NK012, FR901228, флавопиридол); ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб, цетуксимаб, панитумумаб)); ингибитор множественной киназы (например, сорафениб, сунитиниб); ингибитор VEGF (например, бевацизумаб, вандетаниб); вакцину против рака (например, GVAX); ингибитор Bcl-2 (например, облимурсен натрий, АВТ-263); ингибитор протеосом (например, бортезомиб (Велкейд), NPI-0052), паклитаксел или агент паклитаксела; доцетаксел; ингибитор рецептора IGF-1 (например, AMG 479); ингибитор HGF/SF (например, AMG 102, МК-0646); хлорохин; ингибитор киназы Аурога (например, MLN8237); радиоиммунотерапию (например, TF2); ингибитор HSP90 (например, танеспимицин, STA-9090); ингибитор mTOR (например, эверолимус); биспецифическое антитело к Ep-CAM/CD3 (например, MT110); ингибитор СК-2 (например, CX-4945); ингибитор HDAC (например, белиностат); антагонист SMO (belinostat, BMS 833923); пептидную противораковую вакцину и лучевую терапию (например, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), гипофракционированную лучевую терапию, радиотерапию с контролем гипоксии), хирургическое вмешательство и их комбинации.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения немелкоклеточного рака легкого, включают в себя химиотерапевтический агент (например, винорелбин, цисплатин, доцетаксел, пеметрексед динатрий, этопозид, гемцитабин, карбоплатин, липосомный SN-38, TLK286, темозоломид, топотекан, пеметрексед динатрий, азацитидин, иринотекан, тегафур-гимерацил-отерацил-калий, сапацитин); ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб, цетуксимаб, панитумумаб, нецитумумаб, PF-00299804, нимотузумаб, RO5083945)), ингибитор MET (например, PF-02341066, ARQ 197), ингибитор киназы PI3K (например, XL147, GDC-0941), ингибитор двойной киназы Raf/MEK (например, RO5126766), ингибитор

двойной киназы PI3K/mTOR (например, XL765), ингибитор SRC (например, дасатиниб), двойной ингибитор (например, BIBW 2992, GSK1363089, ZD6474, AZD0530, AG-013736, лапатиниб, MEHD7945A, линифаниб), ингибитор множественной киназы (например, сорафениб, сунитиниб, пазопаниб, AMG 706, XL184, MGCD265, BMS-690514, R935788), ингибитор VEGF (например, эндостар, эндостатин, бевацизумаб, цедираниб, BIBF 1120, акситиниб, тивозаниб, AZD2171), вакцина против рака (например, вакцина липосом BLP25, GVAX, рекомбинантная ДНК и аденовирус, экспрессирующий белок L523S), ингибитор Bcl-2 (например, облимержен натрий), ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб, NPI-0052, MLN9708), паклитаксел или агент паклитаксела, доцетаксел, ингибитор рецептора IGF-1 (например, циксутумумаб, МК-0646, OSI 906, CP-751,871, ВВ022), гидроксихлорохин, ингибитор HSP90 (например, танеспимицин, STA-9090, АUY922, XL888), ингибитор mTOR (например, эверолимус, темсиролимус, ридафоролимус), биспецифическое антитело Ep-CAM/CD3 (например, МТ110), ингибитор СК-2 (например, CX-4945), ингибитор HDAC (например, MS 275, LBH589, вориностат, вальпроевая кислота, FR901228), ингибитор DNFR (например, пралатрексат), ретиноид (например, бексаротен, третиноин), конъюгат антитела с лекарственным средством (например, белагептумагуцел-L), низкомолекулярный гепарин (LMWH) (например, тинзапарин, эноксапарин), GSK1572932A, мелатонин, талактоферрин, димесна, ингибитор топоизомеразы (например, амрубицин, этопозид, каренитецин), нелфинавир, циленгитид, ингибитор ErbB3 (например, ММ-121, U3-1287), ингибитор сурвивина (например, YM155, LY2181308), эрибулина мезилат, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), пегфилграстим, ингибитор Polo-образной киназы 1 (например, BI 6727), агонист рецептора 2 к TRAIL (TR-2) (например, CS-1008), конъюгат пептида CNGRC (SEQ ID NO: 225) и ФНО-альфа, дихлорацетат (DCA), ингибитор HGF (например, SCH 900105), SAR240550, агонист PPAR-гамма (например, CS-7017), ингибитор гамма-секретазы (например, RO4929097), эпигенетическая терапия (например, 5-азациитидин), нитроглицерин, ингибитор MEK (например, AZD6244), ингибитор зависимой от циклина киназы (например, UCN-01), холестерин-Fus1, агент антитубулина (например, E7389), ингибитор фарнезил-ОН-трансферазы (например, лонафарниб), иммунотоксин (например, ВВ-10901, SS1 (dsFv) PE38), фондапаринукс, разрушающий сосуды агент (например, AVE8062), ингибитор PD-L1 (например, MDX-1105, MDX-1106), бета-глюкан, NGR-hTNF, EMD 521873, ингибитор MEK (например, GSK1120212), аналог эпотилона (например, иксабепилон), ингибитор кинезина веретена (например, 4SC-205), нацеленный на теломеры агент (например, KML-001), ингибитор пути P70 (например, LY2584702), ингибитор АКТ (например, МК-2206), ингибитор ангиогенеза (например, леналидомид), ингибитор сигнализации Notch (например, OMP-21M18), биспецифическое антитело EM-1 к EGFR/c-Met, как описано в US 2014/0141000 A1, радиационная терапия, хирургия и их комбинации.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения рака яичников, включают химиотерапевтический агент (например, паклитаксел или агент паклитаксела; доцетаксел; карбоплатин; гемцитабин; доксорубин; топотекан; цисплатин; иринотекан, TLK286, ифосфамид, олапариб, оксалиплатин, мелфалан, пеметрексед династрий, SJG-136, циклофосфамид, этопозид, децитабин); Антагонист грелина (например, AEZS-130), иммунотерапию (например, APC8024, ореговомаб, OPT-821), ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (например, эрлотиниб), ингибитор двойной киназы (например, E7080), ингибитор множественной киназы (например, AZD0530, JI-101, сорафениб, сунитиниб, пазопаниб), ON 01910.Na), ингибитор VEGF (например, бевацизумаб, BIBF 1120, цедираниб, AZD2171), ингибитор PDGFR (например, IMC-3G3), паклитаксел, ингибитор топоизомеразы (например, каренитецин, иринотекан), ингибитор FIDAC (например, вальпроат, вориностат), ингибитор рецептора фолата (например, фарлетузумаб), ингибитор ангиопоэтина (например, AMG 386), аналог эпотилона (например, иксабепилон), ингибитор протеасом (например, карфилзомиб), ингибитор рецептора IGF-1 (например, OSI 906, AMG 479), ингибитор PARP (например, велипариб, AG014699, инипариб, МК-4827), ингибитор киназы Auroга (например, MLN8237, ENMD-2076), ингибитор ангиогенеза (например, леналидомид), ингибитор DFIFR (например, пралатрексат), радиоиммунотерапевтический агент (например, Hu3S193), статины (например, ловастатин), ингибитор топоизомеразы-1 (например, NKTR-102), вакцину против рака (например, вакцина p53 из синтетических длинных пептидов, вакцина из аутологичного OC-DC), ингибитор mTOR (например, темсиролимус, эверолимус), ингибитор BCR/ABL (например, иматиниб), антагонист рецептора ET-A (например, ZD4054), агонист рецептора-2 к TRAIL (TR-2) (например, CS-1008), ингибитор HGF/SF (например, AMG 102), EGEN-001, ингибитор Polo-образной киназы 1 (например, BI 6727), ингибитор гамма-секретазы (например, RO4929097), ингибитор Wee-1 (например, МК-1775), антитубулиновый агент (например, винорелбин, E7389), иммунотоксин (например, денилейкин дифтитокс), SB-485232, разрушающий сосуды агент (например, AVE8062), ингибитор интегрина (например, EMD 525797), ингибитор кинезина веретена (например, 4SC-205), ревлимид, ингибитор HER2 (например, MGH22), ингибитор ErbB3 (например, ММ-121), радиационную терапию и их комбинации.

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению для лечения рака почки, например, почечно-клеточной карциномы (ПКК) или метастатической ПКК, включают иммунооснованную стратегию (например, интерлейкин-2 или интерферон- α), нацеленный агент

(например, ингибитор VEGF, например моноклональное антитело к VEGF, например, бевацизумаб (Rini et al., (2010) J Clin Oncol 28(13): 2137-2143)); ингибитор тирозинкиназы VEGF, такой как сунитиниб, сорафениб, акситиниб и пазопаниб (обзор в Pal et al., (2014) Clin Advances in Hematology & Oncology 12(2): 90-99); ингибитор РНКи, или ингибитор нижележащего медиатора сигнального пути VEGF, например, ингибитор мишени рапамицина (mTOR) у млекопитающего, например, эверолимус и темсиролимус (Hudes et al., (2007) N Engl J Med 356(22): 2271-2281, Motzer et al., (2008) Lancet 372: 449-456).

Наборы PSMA-специфических антител

В настоящем документе описаны наборы, включающие описанные PSMA-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения PSMA-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении наличия PSMA в биологической пробе. Соответственно, описанные наборы могут включать одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой набор, содержащий антитело по изобретению, специфически связывающее PSMA.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой набор, содержащий биспецифическое антитело к PSMA x CD3, которое содержит первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, по изобретению.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия PSMA, CD3 или PSMA и CD3 в биологической пробе.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, описанное в настоящем документе, и реагенты для обнаружения антитела. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, находящееся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363 и PSMB365.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит биспецифическое антитело к PSMA x CD3, PS3B22, PS3B23, PS3B25, PS3B27, PS3B28 или PS3B30.

Способы обнаружения PSMA или PSMA и CD3

Один вариант осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, представляет собой способ обнаружения PSMA в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение пробы в контакт с антителом-антагонистом, специфически связывающим PSMA, по изобретению и обнаружение в пробе антитела, связанного с PSMA.

Один вариант осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, представляет собой способ обнаружения PSMA и CD3 в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение пробы в контакт с биспецифическим антителом, которое содержит первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, по изобретению и обнаружение антитела, связанного с PSMA и CD3, в пробе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, образец можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, биоптатов, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

Описанные в данном документе антитела по изобретению, связанные с PSMA или PSMA и CD3, могут быть обнаружены известными методами. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как

биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антитела по изобретению можно применять в разнообразных анализах для обнаружения PSMA или PSMA и CD3 в пробе. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Варианты осуществления

1) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент (i) связывается с клетками, экспрессирующими рекомбинантный PSMA Pan troglodytes, причем связывание с клетками измеряют с помощью проточной цитометрии, и (ii) связывается с рекомбинантным внеклеточным доменом PSMA Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) с аффинностью около 30 нМ или менее, причем аффинность измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса Proteon XPR36.

2) Антитело по варианту осуществления 1, которое имеет одно, два, три или четыре из следующих свойств:

а) связывает клетки LNCaP с расчетной EC_{50} 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие PSMA *Macaca fascicularis*, с расчетной EC_{50} 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC_{50} между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC_{50} измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

б) связывается с рекомбинантным ВКД PSMA человека (SEQ ID NO: 7), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) и *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5) при равновесной константе диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса ProteOn XPR36 при +25°C;

в) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток НЕК, экспрессирующих PSMA человека, или клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, при объединении в пару биспецифического антитела CD3B219 к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7; или

д) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 3).

3) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно.

4) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 12 и 24 соответственно.

5) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно.

6) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 и 41 соответственно.

7) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42, 43, 11, 12 и 13 соответственно.

8) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44, 45, 46, 29 и 47 соответственно.

9) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 48, 49, 50 и 51 соответственно.

10) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 52, 49, 50 и 51 соответственно.

11) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13 соответственно.

12) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 12 и 35 соответственно.

13) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 53, 54, 55, 23, 12 и 35 соответственно.

14) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123, 124, 23, 12 и 24 соответственно.

15) Антитело по варианту осуществления 2, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 75, 77, 79 или 160.

16) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее вариабельную область легкой цепи (VL) с

SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 61, 76 или 78.

- 17) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63.
- 18) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65.
- 19) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.
- 20) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 72 и VL с SEQ ID NO: 73.
- 21) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61.
- 22) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76.
- 23) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 78.
- 24) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 79 и VL с SEQ ID NO: 78.
- 25) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65.
- 26) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61.
- 27) Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 68 и VL с SEQ ID NO: 69.
Антитело по варианту осуществления 15, содержащее VH с SEQ ID NO: 70 и VL с SEQ ID NO: 71.
- 28) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42, 43, 11, 12 и 13 соответственно.
- 29) Антитело по варианту осуществления 28, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61.
- 30) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно.
- 31) Антитело по варианту осуществления 30, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63.
- 32) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно.
- 33) Антитело по варианту осуществления 32, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.
- 34) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 и 41 соответственно.
- 35) Антитело по варианту осуществления 34, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 72 и VL с SEQ ID NO: 73.
- 36) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123, 124, 23, 12 и 24 соответственно.
- 37) Антитело по варианту осуществления 36, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65.
- 38) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13 соответственно.
- 39) Антитело по варианту осуществления 38, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61.
- 40) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 12 и 24 соответственно.
- 41) Антитело по варианту осуществления 40, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65.
- 42) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 12 и 35 соответственно.
- 43) Антитело по варианту осуществления 42, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 70 и VL с SEQ ID NO: 71.
- 44) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44, 45, 46, 29 и 47 соответственно.
- 45) Антитело по варианту осуществления 44, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76.
- 46) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 48, 49, 50 и 51 соответственно.
- 47) Антитело по варианту осуществления 46, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 77 и VL с

держашее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 133 и 132 соответственно.

73) Антитело по варианту осуществления 72, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 143.

74) Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 137, 27, 28, 133 и 132 соответственно.

75) Антитело по варианту осуществления 74, где антитело содержит VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143.

76) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-75, которое является человеческим или гуманизированным.

77) Антитело по варианту осуществления 76, в котором антитело относится к изотипу IgG4 или IgG1.

78) Антитело по варианту осуществления 77, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

79) Антитело по варианту осуществления 77, содержащее:

a) замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S;

b) замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S;

c) замены F234A, L235A, G237A, P238S и Q268A;

d) замены L234A, L235A или L234A и L235A;

e) замены F234A, L235A или F234A и L235A; или

f) замена V234A, причем нумерация остатков соответствует каталогу EU.

80) Антитело по варианту осуществления 79, содержащее замены S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует каталогу EU.

81) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-80, которое является биспецифическим.

82) Антитело по варианту осуществления 76, которое специфически связывает PSMA и специфически связывает CD3, CD5, CD28, CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C и NKG2D, DNAM, NCR, CD18, CD89, CD18, CD32, CD64, CD64 и CD35.

83) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по варианту осуществления 1-82 и фармацевтически приемлемый носитель.

84) Полинуклеотид, кодирующий VH антитела по варианту осуществления 15, VL антитела по варианту осуществления 16 или VH антитела и VL антитела по варианту осуществления 15 или 16.

85) Полинуклеотид, кодирующий VH антитела, VL антитела или VH антитела и VL антитела по любому одному из вариантов осуществления 28-75.

86) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 84.

87) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 85.

88) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 86.

89) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 87.

90) Способ продуцирования антитела в соответствии с вариантом осуществления 1, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 89 в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцированного клеткой-хозяином.

91) Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому одному из вариантов осуществления 1-82 субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

92) Способ согласно варианту осуществления изобретения 91, в котором злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль, злокачественную опухоль или новообразованные сосуды опухоли.

93) Способ по варианту осуществления 92, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

94) Способ по варианту осуществления 93, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы, злокачественный рак предстательной железы.

95) Способ по любому одному из пп.90-94, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

96) Способ по варианту осуществления 95, в котором второй терапевтический агент представляет собой стандартный лекарственный препарат для лечения солидной опухоли или злокачественной опухоли или новообразованных сосудов опухоли.

97) Способ по варианту осуществления 96, в котором второй терапевтический агент представляет

собой ингибитор гормона, противомикробный агент микротрубочек, ингибитор киназы, иммуномодулирующий агент, ингибитор топоизомеразы, антимаболит, ингибитор митоза, алкилирующий агент, антрациклин, алкалоид барвинка, интеркалирующий агент, агент, способный влиять на сигнальный путь трансдукции, агент, стимулирующий апоптоз, ингибитор протеасом или облучение.

98) Способ по варианту осуществления 96, в котором второй терапевтический агент представляет собой вакцину.

99) Способ по варианту осуществления 98, в котором вакцина представляет собой полипептид или его фрагмент либо ДНК или РНК, кодирующую полипептид или его фрагмент, экспрессированный на опухолевых клетках.

100) Способ по варианту осуществления 99, в котором полипептид представляет собой PSMA, мезотелин, EGFR или EGFR RvIII.

101) Способ по варианту осуществления 95, в котором второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или отдельно.

102) Способ по любому одному из вариантов осуществления 91-101, в котором субъект получал или получает лечение лучевой терапией.

103) Способ по любому одному из п.91-101, в котором субъект проходил или будет проходить хирургическое вмешательство.

104) Способ по любому одному из вариантов осуществления 46-58, в котором выделенное антитело содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

105) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-82 для применения в терапии.

106) Связывание антиидиотипического антитела с антителом по любому одному из вариантов осуществления 1-82.

107) Биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает PSMA, и второй домен, который специфически связывает CD3, причем первый домен содержит:

a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42, 43, 11, 12 и 13 соответственно;

b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно;

c) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно;

d) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 и 41 соответственно;

e) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123, 124, 23, 12 и 24, соответственно;

f) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, и 13 соответственно;

g) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно;

h) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 12 и 24 соответственно;

i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 12, и 35 соответственно;

j) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44, 45, 46, 29 и 47 соответственно;

k) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 48, 49, 50 и 51 соответственно;

l) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 53, 54, 55, 23, 12, и 35 соответственно;

m) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 28, 29 и 30 соответственно;

n) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 131, 29 и 132 соответственно;

o) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 28, 133, и 132 соответственно;

p) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29 и 30 соответственно;

q) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 29 и 136 соответственно;

r) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 29 и 30 соответственно;

s) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 131, 29 и 132 соответственно;

- t) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 133, и 132 соответственно;
- u) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29 и 136 соответственно;
- v) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 131, 29 и 132 соответственно;
- w) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 133, и 132 соответственно; или
- x) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 137, 27, 28, 133, и 132 соответственно.
- 108) Биспецифическое антитело по варианту осуществления 107, в котором первый домен содержит:
- a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42, 43, 11, 12 или 13 соответственно и VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61;
- b) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 или 19 соответственно и VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63;
- c) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 или 30 соответственно и VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67;
- d) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 или 41 соответственно и VH с SEQ ID NO: 72 и VL с SEQ ID NO: 73;
- e) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123, 124, 23, 12 или 24 соответственно и VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65;
- f) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, и 13 соответственно и VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61;
- g) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 и 19 соответственно и VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63;
- h) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 12 и 24 соответственно и VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65;
- i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 12, и 35 соответственно и VH с SEQ ID NO: 70 и VL с SEQ ID NO: 71;
- j) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44, 45, 46, 29 и 47 соответственно и VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76;
- k) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 37, 48, 49, 50 и 51 соответственно и VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 78;
- l) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 53, 54, 55, 23, 12, и 35 соответственно и VH с SEQ ID NO: 68 и VL с SEQ ID NO: 69;
- m) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 28, 29, и 30 соответственно и VH с SEQ ID NO: 138 и VL с SEQ ID NO: 67;
- n) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 131, 29 или 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 138 и VL с SEQ ID NO: 142;
- o) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 130, 27, 28, 133, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 138 и VL с SEQ ID NO: 143;
- p) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29, и 30 соответственно и VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 167;
- q) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 29, и 136 соответственно и VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;
- r) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 29, и 30 соответственно и VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 167;
- s) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 131, 29, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 142;
- t) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 135, 27, 28, 133, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;
- u) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 29 и 136 соответственно; и VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 144;
- v) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 131, 29, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 142;
- w) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 134, 27, 28, 133, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 139 и VL с SEQ ID NO: 143; или
- x) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 137, 27, 28, 133, и 132 соответственно и VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143.

109) Выделенное биспецифическое антитело к PSMA/CD3, содержащее первый домен, который (i) связывается с клетками, экспрессирующими рекомбинантный PSMA Pan troglodytes, причем связывание с клетками измеряют методом проточной цитометрии и (ii) связывается с внеклеточным доменом реком-

бинантного PSMA Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) с аффинностью около 30 нМ или менее, причем аффинность измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса Proteon, специфически связывающего PSMA, и второго домена, специфически связывающего CD3.

110) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, в котором антитело

а) связывает клетки LNCaP с расчетной EC₅₀ 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие PSMA *Macaca fascicularis*, с расчетной EC₅₀ 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC₅₀ между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC₅₀ измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии,

б) связывает ВКД рекомбинантного PSMA от человека (SEQ ID NO: 7), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 4) и *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5) с равновесной константой диссоциации (KD) 12 нМ или менее, при этом KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

в) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток НЕК, экспрессирующих PSMA человека, или клеток НЕК, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7, или

д) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 3).

111) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, в котором антитело связывается с Т-клетками.

112) Биспецифическое PSMA x CD3 антитело по варианту осуществления 109, в котором первый домен содержит

а) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

б) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно;

в) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно;

д) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 44 и 45 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 46, 29 и 47 соответственно;

е) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 31, 42 и 43 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно; или

ф) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 122, 123 и 124 соответственно и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно.

113) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

а) SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

б) SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно;

в) SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

д) SEQ ID NO: 31, 44 и 45 соответственно;

е) SEQ ID NO: 31, 42 и 43 соответственно; или

ф) SEQ ID NO: 122, 123 и 124 соответственно.

114) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, в котором первый домен содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

а) SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно;

б) SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно;

в) SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно;

д) SEQ ID NO: 46, 29 и 47 соответственно;

е) SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно; или

ф) SEQ ID NO: 23, 12 и 24 соответственно.

115) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, в котором

а) первый домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 62 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 63, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105;

в) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105;

д) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105;

е) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105;

ф) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 160 и VL с SEQ ID NO: 65, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105.

116) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109, содержащее первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), причем HC1 и LC1 содержат аминокислотные последовательности с

- a) SEQ ID NO: 84 и 85 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 86 и 87 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 88 и 89 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 125 и 91 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 94 и 95 соответственно; или
- f) SEQ ID NO: 96 и 83 соответственно.

117) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 116, в котором HC2 и LC2 содержат SEQ ID NO: 110 и 111 соответственно.

118) Биспецифическое антитело к PSMA с CD3 по варианту осуществления 109, содержащее HC1, LCI, HC2 и LC2 с

- a) SEQ ID NO: 84, 85, 110 и 111 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 86, 87, 110 и 111 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 88, 89, 110, 111 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 125, 91, 110 и 111 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 94, 95, 110 и 111 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 96, 83, 110 и 111 соответственно.

119) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по любому одному из вариантов осуществления 109-118, которое является человеческим или гуманизированным.

120) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 119, представляющее собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

121) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 120, в котором антитело относится к изотипу IgG1 или IgG4.

122) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по любому одному из вариантов осуществления 120 или 121, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

123) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 121, содержащее:

- a) замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S;
- b) замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S;
- c) замены F234A, L235A, G237A, P238S и Q268A;
- d) замены L234A, L235A или L234A и L235A;
- e) замены F234A, L235A или F234A и L235A;
- f) замену V234A; или
- g) замены S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

124) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по любому одному из вариантов осуществления 109-123, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене антитела CH3.

125) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 124, в котором замена в константном домене антитела CH3 представляет собой замену 409 R, F405L или F405L/R409K, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

126) Биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 124, в котором антитело содержит

a) замену F405L в HC1 и замену 409 R в HC2, причем антитело относится к изотипу IgG1; b) замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S и F405L в HC1 и V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S и 409 R в HC2, причем антитело относится к изотипу IgG1; или

c) замену S228P в HC1 и замену S228P, F405L и R409K в HC2, причем антитело относится к изотипу IgG4.

127) Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к PSMA x CD3 по варианту осуществления 109-126 и фармацевтически приемлемый носитель.

128) Полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело к PSMA x CD3 в HC1, LC1, HC2 или LC2 по варианту осуществления 118.

129) Вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий HC1, LC1, HC2, LC2, HC1 и LC1 или HC2 и LC2 по варианту осуществления 128.

130) Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 129.

131) Способ продуцирования биспецифического антитела к PSMA x CD3 в соответствии с вариантом осуществления 118, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 130 в условиях экспрессии антитела и выделение и очистку биспецифического антитела к PSMA x CD3, продуцированного клеткой-хозяином.

132) Способ продуцирования биспецифического антитела к PSMA x CD3 по варианту осуществления 118, включающий:

а) объединение моноспецифического двухвалентного антитела PSMA, имеющего две идентичные HC1 и две идентичные LC1, и моноспецифического двухвалентного антитела CD3, имеющего две идентичные HC2 и две идентичные LC2, в смеси с молярным соотношением около 1:1;

б) введение в смесь восстанавливающего агента;

с) инкубирование смеси в течение от около девяноста минут до около шести часов;

д) удаление восстанавливающего агента; и

е) очистку биспецифического антитела к CD3 x PSMA, которое содержит HC1, LC1, HC2 и LC2.

133) Способ по варианту осуществления 132, в котором восстанавливающий агент представляет собой 2-меркаптоэтаноламин (2-МЕА).

134) Способ из варианта осуществления 133, в котором

h) 2-МЕА присутствует в концентрации от около 25 мМ до около 75 мМ; и

i) инкубацию выполняют при температуре от около 25°C до около 37°C.

135) Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического антитела к CD3 x PSMA по любому одному из вариантов осуществления 109-126 субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

136) Способ согласно варианту осуществления изобретения 135, в котором злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль, злокачественную опухоль или новообразованные сосуды опухоли.

137) Способ по варианту осуществления 136, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

138) Способ по варианту осуществления 137, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы, злокачественный рак предстательной железы.

139) Способ по любому одному из вариантов осуществления 135-138, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

140) Способ по варианту осуществления 139, в котором второй терапевтический агент представляет собой стандартный лекарственный препарат для лечения солидной опухоли или злокачественной опухоли или новообразованных сосудов опухоли.

141) Способ по варианту осуществления 139, в котором второй терапевтический агент представляет собой ингибитор гормона, противомикробный агент микротрубочек, ингибитор топоизомеразы, антитаболит, ингибитор митоза, алкилирующий агент, антрациклин, алкалоид барвинка, интеркалирующий агент, агент, способный влиять на сигнальный путь трансдукции, агент, стимулирующий апоптоз, ингибитор протеосом или облучение.

142) Способ по варианту осуществления 139, в котором второй терапевтический агент представляет собой вакцину.

143) Способ по варианту осуществления 142, в котором вакцина представляет собой полипептид или его фрагмент либо ДНК или РНК, кодирующую полипептид или его фрагмент, экспрессированный на опухолевых клетках.

144) Способ по варианту осуществления 143, в котором полипептид представляет собой PSMA, мезотелин, EGFR или EGFR RvIII.

145) Способ по варианту осуществления 139, в котором второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или отдельно.

146) Способ по любому одному из вариантов осуществления 135-145, в котором субъект получал или получает лечение лучевой терапией.

147) Способ по любому одному из п.135-145, в котором субъект проходил или будет проходить хирургическое вмешательство.

148) Способ по любому одному из вариантов осуществления 135-145, в котором первый домен биспецифического антитела к PSMA x CD3 содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL или SEQ ID NO: 67, а второй домен биспецифического антитела к PSMA x CD3 содержит VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105.

149) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 109-126 для применения в терапии.

150) Связывание антиидиотипического антитела с антителом по любому одному из вариантов осуществления 109-126.

Пример 1. Материалы.

Создание клеточных линий PSMA.

Векторы экспрессии, представляющие полноразмерный PSMA шимпанзе (H2Q3K5_PANTR, SEQ

ID NO: 1) или полноразмерный PSMA яванского макака (EHH56646.1, SEQ ID NO: 2) были созданы для применения в качестве инструментов скрининга при оценке лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Векторы временно трансфицировали в клетки HEK293F в суспензии с использованием стандартных способов. Трансфицированные суспензионные клетки 293F помещали в среду роста с сывороткой, чтобы они стали прикрепленными, и отбирали для стабильной интеграции плазмиды. Популяции отдельных клеток были отобраны путем серийных разведений, и экспрессия поверхностного рецептора PSMA была количественно определена с помощью FACS с использованием аффинно очищенного кроличьего поликлонального антитела (антитело PSMAL (Центр) (каталог № OAAB02483, Aviva Systems Biology) в качестве первичного антитела с конъюгированным с R-PE антикроличьим вторичным антителом (каталожный № 111-116-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и кроличьим поликлональным IgG (каталожный № SC-532, Santa Cruz Biotechnology) в качестве изотипического контроля).

Для отбора PSMA-положительных клеток создавали клеточные линии, экспрессирующие человеческий PSMA, с применением лентивируса (Geneservice, кат. № EX-G0050-Lv105-10), содержащего полноразмерный PSMA человека (FOLH1_HUMAN, SEQ ID NO: 3) и пуromидин. Клетки HEK293F (ATCC), отрицательные по PSMA, трансдуцировали лентивирусными частицами для сверхэкспрессии PSMA человека. После трансдукции клетки, положительно экспрессирующие PSMA и маркер устойчивости, отбирали обработкой объединенных клеток, выращивали в среде DMEM+10% HI FBS (Life Technologies) и дополняли различными концентрациями пуromидина (Life Technologies).

Кроме полученных с помощью HEK линий клеток, для анализов методом фагового пэннинга, и анализов связывания, и клеточной токсичности использовали несколько коммерческих линий клеток. Клетки LNCaP клона FGC (ATCC кат. № CRL-1740) представляют собой коммерчески доступные линии клеток рака предстательной железы человека. Клетки C4-2B были первоначально созданы в MD Anderson, и получены из LNCaP FGC, выращенных *in vivo* и метастазирующих в костный мозг (Thalmann, et al., 1994, Cancer Research, 54, 2577-81).

Получение растворимого белка ВКД PSMA.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA шимпанзе (ВКД PSMA шимпанзе, SEQ ID NO: 4) создавали для пэннинга и оценки лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методики молекулярной биологии. Фрагмент гена ВКД PSMA шимпанзе (аминокислоты 44-750 из SEQ ID NO: 1) с N-концевой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO: 56), N-концевую авидиновую метку (SEQ ID NO: 57) и 6-гистидиновыми метками (SEQ ID NO: 58) клонировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии и временно экспрессировали в клетки 293Expi (Invitrogen). кДНК получали с использованием методов генного синтеза (патент США № 6670127; патент США № 6,521,427). Супернатанты собирали и очищали путем центрифугирования. Белки очищали с использованием двухэтапного способа очистки: 1) очистка IMAC с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, GE Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко, кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ ZnCl₂ для стабилизации димеризации PSMA. Фракции, содержащие интересующий белок, объединяли и определяли концентрацию белка посредством A280. Этот материал использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG8.

ВКД PSMA шимпанзе также биотинилировали для пэннинга. Плазмиду BirA, которую котрансфицировали в клетки млекопитающих в биотинилированные белки, содержащие авидиновую метку, получали самостоятельно. Кодировующую область BirA (SEQ ID NO: 59) сливали с сигнальным пептидом из тяжелой цепи мышинового IgG (SEQ ID NO: 80) и сигналом удерживания ЭР (KDEL ("KDEL" описан как SEQ ID NO: 156) добавляли к C-концу для получения BirA (SEQ ID NO: 112). Сконструированный ген клонировали в вектор экспрессии под контролем промотора CMV. Для получения биотинилированного антигена PSMA плазмидную ДНК PSMA добавляли в 4-кратном избытке (мас./мас.) к плазмиде BirA в смесь для трансфекции.

Биотинилирование белка ВКД PSMA шимпанзе проводили с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструкции экспрессии BirA, и полученный секретированный белок очищали с применением двухэтапного процесса очистки: 1) очистка IMAC с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, GE Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко, кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ ZnCl₂ для стабилизации димеризации PSMA. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA (ВКД PSMA яванского макака, SEQ ID NO: 5), соответствующий аминокислотам 44-750 SEQ ID NO: 2 с N-концевым сигналом (SEQ ID NO: 56), N-концевые авидиновые (SEQ ID NO: 57) и 6-гистидиновые (SEQ ID NO: 58) метки клонировали и экспрессировали, как описано ранее для ВКД PSMA шимпанзе. Биотинилирование белка ВКД PSMA яванского макака выполняли с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструктора экспрессии BirA, и полученный секретированный белок очищали двухэтапной очисткой с использованием колонки

IMAC HisTrap HP (GE Healthcare) и колонок MonoAvidin. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин. Этот материал также использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG1.

Второй рекомбинантный белок ВКД PSMA яванского макака (PSMA яванского макака с Fc, SEQ ID NO: 6) с Fc IgG1 (SEQ ID NO: 81) клонировали и экспрессировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Белок PSMA яванского макака с Fc временно экспрессировался в клетках 293НЕК-ехрі. Продукт временной трансфекции PSMG3 в клетках НЕК293.Ехрі собирали через 5 суток после трансфекции, осветляли центрифугированием (30 мин, 6000 об/мин) и фильтровали (0,2 мкм мембрана из полиэфирсульфона, Corning). Относительное количество IgG определяли с помощью прибора Octet (ForteBio) с использованием очищенного известного IgG (того же изотипа), добавленного в отработанную среду для построения стандартной кривой.

Осветленный супернатант с PSMA яванского макака с Fc загружали в уравновешенную (dPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure Protein A (GE Healthcare) при относительной концентрации ~30 мг белка на мл смолы. После загрузки колонку промывали в dPBS при pH 7,2, и белок элюировали с использованием 10 объемов колонки 0,1 М натрий ацетата, pH 3,5. Фракции пика объединяли, нейтрализовали 2М трис, pH 7, и фильтровали (0,2 мкм). Нейтрализованный образец белка подвергали диализу против 3 замен dPBS, содержащего Ca²⁺, Mg²⁺ и 0,5 мМ ZnCl₂, pH 7,2, в течение ночи при 4°C. На следующий день образец снимали с диализа, фильтровали (0,2 мкм) и определяли концентрацию белка по оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре BioTek SynergyHTTM. Качество очищенных белков оценивали методами ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex). Уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-теста (Pyrotell-T, Associates of Cape Cod). Очищенные белки хранили при 4°C.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен PSMA человека (ВКД) (ВКД PSMA человека, SEQ ID NO: 7), соответствующий аминокислотам 44-750 из SEQ ID NO: 3 с N-концевыми авидиновыми и б-гистидиновыми метками (SEQ ID NO: 58) клонировали, экспрессировали и очищали так, как описано ранее для белков ВКД PSMA шимпанзе и яванского макака.

Пример 2. Идентификация Fab к PSMA шимпанзе и человека.

Пэннинг с рекомбинантным белком. Пэннинг в растворе полученных de novo библиотек человеческого Fab-pIX [Shi, L., et al J Mol Biol, 2010. 397(2): p. 385-396. WO 2009/085462], состоящую из библиотек тяжелых цепей VH1-69, 3-23 и 5-51, спаренных с четырьмя библиотеками генов VL человеческой зародышевой линии (A27, B3, L6, 012), выполняли с использованием подхода чередующегося пэннинга с одним циклом захвата фага на стрептавидиновых гранулах (Invitrogen, кат. № 112.05D, партия № 62992920), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя, с последующим захватом фага на гранулах ProtG (Invitrogen, кат. № 10003D), покрытых PSMA яванского макака с Fc в соответствии с протоколом производителя с последующим захватом фага на магнитных нейтравидиновых гранулах Sera-mag Double Speed (Thermo, кат. № 7815-2104-011150), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя. В результате пэннинга получили два отобранных соединения: PSMB18 и PSMB25.

Цельноклеточный пэннинг Fab к PSMA. Дополнительные эксперименты с пэннингом проводили на целых клетках с использованием выходных данных Раунда № 1 описанных выше экспериментов с пэннингом ВКД шимпанзе или только полученных библиотек фагов de novo в качестве входных данных. Вкратце, фаг получали посредством инфекции хелперного фага и концентрировали посредством осаждения с помощью ПЭГ/NaCl в соответствии со стандартными протоколами, известными в данной области техники. Фаговые библиотеки предварительно очищали на нетрансфицированных исходных клетках НЕК293F в течение ночи при 4°C с осторожным покачиванием. После осаждения с помощью ПЭГ/NaCl предварительно очищенные библиотеки инкубировали с PSMA-экспрессирующими клетками НЕК293 или клетками LNCAP при осторожном покачивании в течение 2 ч при 4°C. Удаление несвязанного фага и выделение связанных с фагом клеток проводили с помощью градиента фикола, и после нескольких стадий промывки клетки, несущие связанный фаг, инкубировали с 1 мл культуры TG-1 E. coli при 37°C в течение 30 минут без встряхивания. Полученную смесь высевали на чашки с лизогенным бульоном с карбенициллином и 1% глюкозой и выращивали в течение ночи при 37°C. Затем процесс повторяли для последующих раундов пэннинга.

Превращение фага Fab-pIX в Fab-His для получения супернатантов E. coli. Полученные отобранные соединения из фагов Fab-pIX превращали в Fab-His с использованием стандартной процедуры. Плазмидную ДНК выделяли из E. coli, используемой в фаговом пэннинге, (набор Plasmid Plus Maxi Kit, Qiagen, кат. № 12963) и подвергали расщеплению рестриктазами NheI/SpeI. Полученные фрагменты размером 5400 и 100 п. н. разделяли на агарозном геле с концентрацией 0,8% и фрагмент из 5400 п. н. очищали на геле (набор MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, кат. № 28006). Очищенную полосу размером 5400 п.н. подвергали самолигированию с использованием лигазы T4, и полученный продукт (кодирующий гибрид Fab-his) снова трансформировали в штамм E.coli TG-1 и клонировали. Супернатанты Fab-His создавали из клонов путем индукции в течение ночи культур с помощью 1 мМ IPTG. После центрифугирования куль-

тивируемой в течение ночи культуры осветленные супернатанты были готовы для использования в последующих анализах. Для определения относительных уровней экспрессии различных супернатантов Fab-his проводили ИФА к каппа (Southern Biotech, кат. № 2061-05) на серийно разведенных супернатантах. Все протестированные клоны продемонстрировали сходную экспрессию Fab-his (данные не показаны).

Клеточное связывание гибридов Fab-his из *E. coli*. Для оценки способности связывания отдельных гибридов Fab-his из супернатантов *E. coli* с клетками, экспрессирующими PSMA, был разработан клеточный анализ связывания. Отдельные клоны Fab выделяли из раунда 3 всех экспериментов с пэннингом после вырезания рIX. Клоны Fab тестировали на связывание с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA шимпанзе и яванского макака, а также с PSMA человека на клетках LNCaP. Вкратце, клетки, экспрессирующие PSMA, помещали в аликвоты планшета с V-образным дном (CoStar 3357) при плотности 200000 на лунку и инкубировали с (100 мкл) супернатантами, экспрессирующими Fab-фрагменты, в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и окрашивали конъюгированным с RPE мышинным антителом к человеческой легкой цепи каппа (Life Technologies, кат. № MH10514) в течение 1 часа на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и ресуспендировали в 100 мкл того же промывочного буфера. Планшеты считывали на проточном цитометре BD FACS. Данные FACS были проанализированы в программном обеспечении FlowJo путем гейтирования нормальной популяции клеток в реальном времени с использованием прямого и бокового рассеяния, а затем анализа клеток внутри этого гейта на окрашивание PE. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) и экспортировали в Microsoft Excel. Клоны Fab, которые проявляли ≥ 3 -кратный фон связывания для всех трех видов PSMA (яванского макака, шимпанзе и человека) и не проявляли связывания с линией клеток НЕК293, были помечены как "предварительно положительные". Fab секвенировали и переносили для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для повторного скрининга. Истинно положительные результаты были выбраны из связывания супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, с линиями клеток, экспрессирующими PSMA.

Получение Fab млекопитающих. Для преобразования Fab *E. coli* в экспрессируемый млекопитающими Fab использовали In-Fusion HD Cloning (ClonTech, кат. № 638918) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, нуклеотидные последовательности клонов, которые прошли первичный скрининг и должны быть переведены в формат Fab млекопитающих, загружаются в программу "InFu Primer Finder v1.2.3" (программное обеспечение, разработанное самостоятельно), которая генерирует перечень изотип-специфических праймеров для ПЦР, используемых для создания ПЦР-фрагментов для клонирования In-Fusion в векторы экспрессии huKappa_muIgGSP и huG1 Fab. Эти векторы представляют собой векторы собственной разработки с промоторами CMV на основе pcDNA3.1. После процесса In-fusion клоны *E. coli* выделяли, последовательность проверяли и трансфицировали в клетки НЕК293, используя стандартные протоколы. Fab к PSMA млекопитающих для подтверждения связывания с линиями клеток, экспрессирующими PSMA, получали путем сбора 20 мл супернатантов через 5 суток после трансфекции.

Повторный скрининг отобранных вариантов из цельноклеточного пэннинга в формате супернатантов клеток млекопитающих. Подтверждение наличия супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, выполняли с использованием анализа связывания целых клеток, описанного ранее. Исследовали связывание Fab с клетками PSMA шимпанзе, яванского макака и человека (LNCaP), а также проводили обратный скрининг на отсутствие связывания с исходной клеточной линией НЕК. В табл. 3 показан профиль отобранных соединений в отношении связывания супернатанта Fab млекопитающих с PSMA-экспрессирующими клетками. Многие отобранные соединения из супернатантов *E. coli* не подтверждаются белками, экспрессируемыми млекопитающими. PSMB47 продемонстрировало высокое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA яванского макака, и некоторое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе, но отсутствие связывания с клетками LNCaP, экспрессирующими PSMA человека. PSMB55 продемонстрировал аналогичный профиль, но с некоторым связыванием с клетками LNCaP. PSMB68-PSMB79 связывается с клетками LNCaP, но не с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе или яванского макака. Супернатанты Fab млекопитающих PSMB51, PSMB55 и PSMB56 связывались со всеми тремя клеточными линиями. PSMB49, PSMB50 и PSMB53 демонстрируют большее связывание с клетками шимпанзе или яванского макака. M58 демонстрировало незначительное связывание с клетками шимпанзе и яванского макака.

Таблица 3

Профиль отобранных соединений связывания белка Fab млекопитающих с клетками, экспрессирующими PSMA по данным измерения гео-СИФ (средняя флуоресцентная интенсивность)

<u>ID белка Fab (ID ДНК Fab)</u>	<u>Яванский макак</u>	<u>Шимпан зе</u>	<u>LNCaP</u>	<u>Исходная HEK</u>
PSMB10 (PSMM10)	244	81,6	-	248
PSMB11 (PSMM11)	19	6,6	-	8,14
PSMB12 (PSMM12)	31,6	8,05	-	12,6
PSMB13 (PSMM13)	57,8	18,2	-	50,5
PSMB14 (PSMM14)	32,6	13,1	-	22,2
PSMB15 (PSMM15)	40,4	18,5	-	38
PSMB16 (PSMM16)	175	220	-	6,39

046641

PSMB17 (PSMM17)	34,9	22,4	-	40,1
PSMB18 (PSMM18)	696	439	-	8,71
PSMB19 (PSMM19)	53,7	-	5,15	4,47
PSMB20 (PSMM20)	5,75	-	5,85	41,3
PSMB21 (PSMM21)	94,4	-	20,7	372
PSMB22 (PSMM22)	9,07	-	7,92	54,9
PSMB23 (PSMM23)	16,4	-	6,66	164
PSMB24 (PSMM24)	14,6	9,6	4,09	3,96
PSMB25 (PSMM25)	15,2	11,3	16,9	4,09
PSMB26 (PSMM26)	9,48	-	7,26	114
PSMB27 (PSMM27)	20	-	7,56	136
PSMB28 (PSMM28)	29,7	-	8,88	302
PSMB29 (PSMM29)	6,87	-	5,7	72,8
PSMB30 (PSMM30)	5,16	-	4,58	45
PSMB31 (PSMM31)	5,99	-	-	25,5
PSMB32 (PSMM32)	4,81	-	-	27,1
PSMB33 (PSMM33)	5,14	-	-	40,1
PSMB34 (PSMM34)	17,9	-	-	107
PSMB35 (PSMM35)	58,5	-	-	231
PSMB36 (PSMM36)	5,05	-	-	6,96
PSMB37 (PSMM37)	23,4	-	-	178
PSMB38 (PSMM38)	4,05	-	-	7,7
PSMB39 (PSMM39)	10,2	-	-	166
PSMB40 (PSMM40)	66,9	-	-	348
PSMB41 (PSMM41)	5,39	-	-	12
PSMB42 (PSMM42)	7,35	-	-	25,8

046641

PSMB43 (PSMM43)	8,73	-	-	7,18
PSMB44 (PSMM44)	12,6	-	-	48,9
PSMB45 (PSMM45)	22,4	-	-	43,1
PSMB46 (PSMM46)	3,88	-	-	5,29
PSMB47 (PSMM48)	101	25,5	3,46	2,85
PSMB48 (PSMM49)	2,72	3,18	2,68	2,72
PSMB49 (PSMM50)	51,6	22	3,22	3,48
PSMB51 (PSMM52)	285	231	41,5	2,68
PSMB52 (PSMM53)	39,2	6,89	2,67	2,56
PSMB53 (PSMM54)	27,6	17,8	4	2,6
PSMB54 (PSMM55)	2,7	2,75	2,65	2,79
PSMB55 (PSMM56)	226	180	17,2	2,58
PSMB56 (PSMM57)	95,6	34,7	24,5	2,52
PSMB57 (PSMM58)	19,8	11	3,26	2,68
PSMB58 (PSMM59)	121	192	25,3	2,67
PSMB59 (PSMM60)	4,96	9,69	6,04	3
PSMB60 (PSMM61)	2,28	3,07	87,3	4,64
PSMB61 (PSMM62)	2,1	3,16	135	2,98
PSMB62 (PSMM63)	7,17	4,43	54,9	9,09
PSMB63 (PSMM64)	2,07	2,95	27	2,82
PSMB64 (PSMM65)	2,39	3,26	70,5	3,05
PSMB65 (PSMM66)	2,3	3,13	32,4	4,25
PSMB66 (PSMM67)	2,14	3	24,6	2,83
PSMB67 (PSMM68)	2,23	2,95	21	2,95
PSMB68 (PSMM69)	5,44	-	134	35,3
PSMB69 (PSMM70)	2,29	3,38	25,5	3,35

046641

PSMB70 (PSMM71)	2,22	3,49	15,5	3,26
PSMB71 (PSMM72)	2,54	4,4	18,5	3,07
PSMB72 (PSMM73)	2,13	3,53	227	3,02
PSMB73 (PSMM74)	2,97	4,13	125	11,1
PSMB74 (PSMM75)	120	-	178	132
PSMB75 (PSMM76)	2,99	3,04	173	7,89
PSMB76 (PSMM77)	3,75	3,99	138	3,95
PSMB77 (PSMM78)	4,68	3,96	144	4,71
PSMB78 (PSMM79)	25,2	-	378	24,4
PSMB79 (PSMM80)	38,4	-	512	157
PSMB80 (PSMM81)	19,6	18,6	20,9	6,61
PSMB81 (PSMM82)	2,63	2,06	4,07	2,69
PSMB82 (PSMM83)	2,79	2,23	4,11	2,76
PSMB83 (PSMM84)	2,59	2,28	4,09	2,74
PSMB84 (PSMM85)	750	729	192	3,15
PSMB85 (PSMM86)	2,84	2,59	2,33	3,24
PSMB86 (PSMM87)	224	176	31,7	2,82
PSMB87 (PSMM88)	2,63	2,27	4,23	2,91
PSMB88 (PSMM89)	37,7	29,7	30,3	7,6
PSMB89 (PSMM90)	27,1	27,3	53,2	39,5
PSMB90 (PSMM91)	26,7	24,7	47,1	36,4
PSMB91 (PSMM92)	8,97	6,16	13	6,63
PSMB92 (PSMM93)	20	16,5	57,1	50
PSMB93 (PSMM94)	5,13	9,62	2,5	3,66
PSMB94 (PSMM95)	5,12	2,67	2,22	3,57
PSMB95 (PSMM96)	8,9	8,82	13,4	11,4

046641

PSMB96 (PSMM97)	2,4	3,25	2,53	4,03
PSMB97 (PSMM98)	2,57	4,73	2,52	3,7
PSMB99 (PSMM100)	9,95	2,4	2,39	4,03
PSMB100 (PSMM101)	4,03	2,52	2,33	3,37
PSMB100 (PSMM101)	3,5	2,86	2,48	4,57
PSMB101 (PSMM102)	5,49	3,18	2,23	3,33
PSMB102 (PSMM103)	2,4	2,42	2,16	3,2
PSMB103 (PSMM104)	3,52	3,26	2,58	4,44
PSMB104 (PSMM105)	2,15	2,5	2,34	3,95
PSMB105 (PSMM106)	2,03	2,39	2,18	3,39
PSMB106 (PSMM107)	2	2,4	2,27	3,59
PSMB107 (PSMM108)	2	2,47	2,33	3,49
PSMB108 (PSMM109)	2	2,58	2,28	3,46
PSMB109 (PSMM110)	321	326	34,9	6,11
PSMB110 (PSMM111)	2,3	2,31	2,31	3,4
PSMB111 (PSMM112)	2,32	2,31	-	3,21
PSMB112 (PSMM113)	6,28	5,7	2,71	3,28
PSMB113 (PSMM114)	2,82	2,95	2,32	3,29
PSMB114 (PSMM115)	2,78	2,47	4,3	3,14
PSMB115 (PSMM116)	2,66	2,59	2,2	3,14
PSMB46 (PSMM117)	4,54	3,18	2,21	4,79
PSMB67 (PSMM118)	3,95	4,3	3	6,13
PSMB74 (PSMM119)	7,94	13	3,16	12,5
PSMB78 (PSMM120)	5,08	4,79	22,3	6,82
PSMB81 (PSMM121)	3,66	3,83	3,05	5,11
PSMB82 (PSMM122)	15,1	28,4	10,8	24,3

PSMB83 (PSMM123)	37,5	42,1	3,04	4,88
PSMB85 (PSMM124)	34,6	52,9	20,7	46,8
PSMB87 (PSMM125)	4,23	3,74	2,26	4,73
PSMB89 (PSMM126)	51,8	53,1	11,7	6,27
PSMB90 (PSMM127)	42,8	30,2	7,74	5,99
PSMB91 (PSMM128)	3,9	27,6	2,37	4,32
PSMB92 (PSMM129)	45,7	37,3	12,1	7,4
PSMB93 (PSMM130)	5,13	7,85	4,11	7,82
PSMB94 (PSMM131)	3,67	3,23	2,32	4,72
PSMB95 (PSMM132)	4,05	3,64	2,56	5,57
PSMB96 (PSMM133)	3,91	4,54	2,37	4,65
PSMB97 (PSMM134)	3,22	3,16	4,08	4,22
PSMB98 (PSMM135)	15,6	12,7	2,22	4,21
PSMB99 (PSMM136)	4,08	3,26	2,22	5,04
PSMB100 (PSMM137)	5,24	3,82	2,16	4,83
PSMB101 (PSMM138)	3,84	3,14	2,23	4,52
PSMB102 (PSMM139)	4,51	3,82	2,23	4,59
PSMB103 (PSMM140)	6,81	4,27	2,21	5,41
PSMB104 (PSMM141)	7,52	4,35	2,26	4,39
PSMB105 (PSMM142)	5,03	11,2	4,87	7,28
PSMB106 (PSMM143)	3,87	3,8	2,73	4,9
PSMB107 (PSMM144)	3,3	3,35	2,3	4,64
PSMB108 (PSMM145)	6,78	3,83	2,33	4,98
PSMB110 (PSMM146)	4,03	3,23	2,28	5,3
PSMB111 (PSMM147)	3,71	3,26	2,36	5,11
PSMB112 (PSMM148)	4,54	3,26	2,26	4,86
PSMB113 (PSMM149)	84,3	104	51,7	94,2
PSMB114 (PSMM150)	3,31	3,26	2,21	5,14
PSMB115 (PSMM151)	3,55	3,43	2,3	4,21

Кривые доза-ответ для Fab, экспрессируемых млекопитающими. После подтверждения положительного связывания клонов Fab, экспрессируемых млекопитающими, в виде чистых супернатантов Fab с линиями клеток, экспрессирующих PSMA, супернатанты нормализовали по концентрации белка с помощью Octet или белкового геля, и строили кривые доза-ответ для подтверждения связывания PSMA с использованием протокола, описанного ранее. На фиг. 1-3 показаны кривые титрования для отобранных

соединений, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя PSMA-экспрессирующими клетками. На фиг. 1 показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток LNCaP. На фиг. 2 показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA шимпанзе. На фиг. 3 показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA яванского макака. PSMG5 (PSMA яванского макака, GenBank: EH56646.1) или PSMG9 (PSMA шимпанзе, эталонная последовательность NCBI: XP_016777253.1) клонировали в экспрессионный вектор млекопитающего между сайтами HindIII и EcoRI под контролем промотора CMV для создания клеточной линии. Сконструированную ДНК трансфицировали в клетки 293 F с использованием липофектамина LTX с последующей селекцией генетицином для отбора PSMA-положительных (PSMG5 или PSMG9) клеток. После отбора клетки подвергали скринингу и сортировке с использованием антител к PSMA (Aviva, кат. № OAAB02483-PSMG9) или антител к PSMA (PSMB18-Janssen Innal) с использованием FACS. Отсортированные по FACS клоны PSMG5 11, 23, 25 и 32 и клоны PSMG9 2, 10, 11, 12, 20 и 24 отобрали и сохранили для скрининга. Последовательности PSMG5 и PSMG9 представлены ниже. Профили связывания среди отобранных соединений сравнивали между линиями клеток, экспрессирующими различные виды PSMA. В экспериментах в качестве положительного контроля использовали супернатант PSMB51. Некоторые отобранные соединения были лишены приоритета из-за N-связанных сайтов гликозилирования в CDR, связывания с PSMA-отрицательной исходной клеточной линией HEK или отсутствия связывания с PSMA-положительными клеточными линиями. Осталось одиннадцать отобранных Fab, а 10 последовательностей отобранных соединений клонировали в конструкты тяжелой цепи человеческого IgG4 PAA и использовали для создания биспецифических антител к PSMA x CD3. Эти отобранные соединения продемонстрировали межвидовое связывание в пределах 3 раз относительно друг от друга и были перенесены в формат биспецифических антител для тестирования на предмет перенаправления Т-клеток, уничтожающих PSMA-положительные мишени.

Антигены для пэннинга для каждого отобранного соединения показаны в табл. 4.

PSMG5 (SEQ ID NO:126)

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSSSEATNITP
 KHNMKAFDELKAENIKKFLHNFTQIPHLGATGEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELTHY
 DVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPYPAGYENVSDIVPPFAFSPQGMPEGDLV
 YVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYGVFRGNKVKNAQLAGATGVILYSDPDD
 YFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANAYARRGMAEAVGLP
 SIPVHPIGYYDAQKLLKMGGSASPSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHST
 SEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGMLKKE
 GWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCT
 PLMYSLVYNLTKELESPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQR
 LGIASGRARYTKNWETNKFSYPLYHSVYETELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVF
 ELANSVVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYNISMKHPQEMKTYSVSFDLSFSAVKNFTEIAS
 KFSERLRDFDKSNPILLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGES
 FPGIYDALFDIESKVDPSQAWGEVQRQISATFTVQAAAETLSEVA

PSMG9 (SEQ ID NO:127)

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSSNEATNITP
 KHNMKAFDELKAENIKKFLYNFTQIPHLGATGEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHY
 DVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPYPAGYENVLDIVPPFAFSPQGMPEGDLV
 YVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYGVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPAD
 YFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANAYARRHGIAEAVGLPS
 IPVHPIGYYDAQKLLKMGGSAPPSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTN
 EVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEG
 WRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPL
 MYSLVYNLTKELESPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLG
 IASGRARYTKNWETNKFSYPLYHSVYETELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFE
 LANSVVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYNISMKHPQEMKTYSVSFDLSFSAVKNFTEIASKFT
 ERLQDFDKSNPILLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPG
 IYDALFDIESKVDPSKAWGDVQRQISVAFTVQAAAETLSEVA

Таблица 4

Антиген для каждого из отобранных при помощи фагового пэннинга соединений

Антиген раунда 1	Антиген раунда 2-3	Отобранные соединения	Идентификация отобранных соединений
ВКД PSMA шимпанзе	ВКД PSMA яванского макака	2	PSMB18, PSMB25
ВКД PSMA шимпанзе	HEK, экспрессирующие PSMA шимпанзе	9	PSMB49, PSMB51, PSMB56, PSMB58, PSMB109, PSMB55, PSMB84, PSMB83
LNCaP	HEK, экспрессирующие PSMA шимпанзе	2	PSMB86, PSMB80

Получение мкАт к PSMA. Всего 12 клонов, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя клетками, экспрессирующими PSMA, в конечном итоге были преобразованы в мкАт IgG4, имеющее замены в Fc изоформа S228P, F234A и L235A (PAA), посредством рестрикционного клонирования. Вкратце, конструкторы, соответствующие клонам Fab, прошедшим первоначальный скрининг, расщепляли *Hind*III и *Apa*I. Очищенные из геля фрагменты лигировали в экспрессионный вектор собственной разработки с промотором CMV для создания экспрессии человеческого IgG4-PAA. Это позволило быстро получить биспецифические антитела. Ранее описанный вектор экспрессии собственной разработки использовали для экспрессии тяжелой и легкой цепей для каждого мкАт к PSMA, при этом оба вектора временно котрансфицировали в линии клеток 293Exp1 или CHO для экспрессии мкАт. Последовательности CDR межвидовых положительных Fab к PSMA, полученных в результате фагового пэннинга, показаны ниже в табл. 5. Последовательности VH и VL выбранных Fab приведены ниже в табл. 6. Последовательности тяжелой и легкой цепей мкАт, полученных из Fab, показаны в табл. 7.

Таблица 5

Последовательности CDR (определенные по Kabat) антител после фагового пэннинга (соответствующие SEQ ID NO перечислены в скобках)

ID FAB		CDR (SEQ ID NO:)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB58	H C	SYWIS (122)	IIYPGDSYTRYSPSF QG (123)	DYEWELFDSRLDY (124)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB10 9	H C	NAWIS (8)	WINPESGRANYAQK FQG (9)	ELYLVYSTYYYAFD Y (10)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB86	H C	SYDIS (14)	GIPIEGTANYAQKF QG (15)	DYPAGYGFDY (16)
	LC	RASQSVSSSYLA (17)	GASSRAT (18)	QQYGSSPLT (19)

PSMB84	H C	SDWMS (20)	AISGNGGSTHEYADS VKG (21)	DPYYYYDGDSYYGM DV (22)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTP (24)
PSMB83	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS VKG (26)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	LC	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB56	H C	SYAIS (31)	WISPYNGNANYAQ KFQG (32)	DSDRSYNLDY (33)
	LC	RASQSIGWLN (34)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)
PSMB55	H C	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSF QG (37)	GLPIWYLDY (38)
	LC	RASQSVASDLA (39)	FASNRAT (40)	QQSITWPFT (41)
PSMB51	H C	SYAIS (31)	WIIPYNGNANYAQK FQG (42)	VNSAALVWERLDY (43)
	LC	RASQSIDRWLN (11)	AASSLQS (12)	QQSPRYPLT (13)
PSMB49	H C	SYAIS (31)	GIIPFGTANYAQKF QG (44)	ASRVWHASYGYLDY (45)
	LC	RASQSVSKWLA (46)	DASNRAT (29)	QQRFTAPWT (47)
PSMB25	H C	SYWIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSF QG (37)	GWAYDRGLDY (48)
	LC	KSSQSVLYSSNNKN	WASTRES	QQYYSTPLT

		YLA (49)	(50)	(51)
PSMB18	H C	SYWIG (36)	IIYPGDS DTRYSPSF QG (37)	AYHYSKGLDY (52)
	LC	KSSQSVLYSSNNKN YLA (49)	WASTRES (50)	QQYYSTPLT (51)
PSMB80	H C	DY AIS (53)	RIDPIEGTANYAQKF QG (54)	DRYYYYDGVYWYSDY FDY (55)
	LC	RASQSISSYLN (23)	AASSLQS (12)	QQSYSTPLT (35)

Было создано моноспецифическое антитело PSMB119 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 79 и VL с SEQ ID NO: 78 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB120 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 78 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB121 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 76 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB122 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 61 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB123 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 72 и VL с SEQ ID NO: 73 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB124 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 70 и VL с SEQ ID NO: 71 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB126 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 68 и VL с SEQ ID NO: 69 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB127 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB128 к PSMA (Альт. ID Fab: PSMB84), содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 65 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB129 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 61 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A.

Было создано моноспецифическое антитело PSMB130 к PSMA, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 63 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A.

Последовательности VH и VL Fab к PSMA

ID FAB	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB109	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNSAALVWERL DYWGQGTLVTVSS	60	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	61
PSMB86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSYDISWVRQAPGQG LEWMGGIPIEGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDYPAGYGFYWGQG TLVTVSS	62	EIVLTQSPGTLISLSPG ERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQ QYGSPLTFGQGTK VEIK	63
PSMB84	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFDSDWMSWVRQAPGKG LEWVSAISGNGGSTEYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDPYYYYDGDSYY GMDVWGQGTLVTVSS	64	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	65
PSMB83	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGGYTNVADSVKG	66	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP	67

	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLVVDYF DYWGQGLVTVSS		RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB80	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFDDYAIWVRQAPGQG LEWMGRIDPIEGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARD RYYYDGVYWYS DYFDYWGQGLVTVSS	68	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSIS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	69
PSMB58	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWISWVRQMPGKGL EWMGIIPGDSYTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCARDYEWELFDSRLDYW GQGLVTVSS	160	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSIS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	65
PSMB56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAIWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDSDRSYNLDYW GQGLVTVSS	70	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSI GWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGQGTK VEIK	71
PSMB55	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT	72	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVAS DLAWYQQKPGQAP RLLIYFASN RATGIP	73

	AMYVCARGLPIWYLDYWGQGT LVTVSS		ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QSITWPFTFGQGTKV EIK	
PSMB51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGWIIPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNSAALVWERL DYWGQGTTLVTVSS	74	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	61
PSMB49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARASRVWHASYGYLDY WGQGTTLVTVSS	75	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSK WLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRTGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRFTAPWTFGQGTK VEIK	76
PSMB25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS TRYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARGWAYDRGLDYWGQ GTLVTVSS	77	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIY WAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIK	78
PSMB18	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS TRYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARAYHYSKGLDYWGQ	79	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIY WAS TRESGVPDRFSGSGS	78
	GTLVTVSS		GTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIK	

Последовательности тяжелой и легкой цепей мкАт с соответствующими SEQ ID NO

Идентификатор mAb	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB129 (FAB PSMB109)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGWISPYN GNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARVNSAALVWERL DYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHDKPSNTKVDKRV SKYGPCCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK	82	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	83
PSMB130	QVQLVQSGAEVKKPGSSV	84	EIVLTQSPGTLSPGER	85

(FAB PSMB86)	KVSCKASGGTFKSYDISW VRQAPGQGLEWMGGIPIE GTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDYPAGYGFYD WQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDRVESKY GPPCPPCAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL GK		ATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGG TDFLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
PSMB128 (FAB PSMB84)	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFDSDWMSWV RQAPGKGLEWVSAISNGG GSTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDPYYYDGDYSY YGMDVWGQTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQ	86	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGGT DFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDS	87

	SSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK		TYLSSTLTLISKADYEK HKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
PSMB127 (FAB PSMB83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGGG YTNYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTY TCNVDPHKPSNTKVDKRV SKYGPCCPPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGL PPSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVS	88	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGGT DFTLTISSELEPEFAVYY CQQRSNWPLTFGGQTK VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVELLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLISKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	89

	<p>TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK</p>			
<p>PSMB127 DNA</p>	<p>atggcctgggtgtggacctgctattctga tggcagctgccc aaagtatacaggccga ggttcagctgctggaatctggcggaggat tggttcagcctggcggctctctgagactgt cttgtgccgttcttggcttcacctcaagtc cgacgctatgactgggtccgacaggcc cctggaaaaggactggaatgggtgtccg agatctctggctctggcggctacaccaact acgccgactccatgaagtcccgggtcacc atctctgggacaactccaagaacacct gtacctgcagatgaaacctgagagccg aggacaccgccgtgactactgcgccag agactcctacgactccagcctgtactgtg gcgactacttcgattattggggccagggc acctgtgtcaccgtttcttctgtccacca agggcccatccgtcttcccctggcggcc tgcctcaggagcacctccgagagcacag ccgccctgggtgcctggtcaaggactac ttcccgaaccggtgacggtgtcgtggaa ctcaggcgcctgaccagcggcgtgcac acctcccggctgtctactagtcctcagga ctetactccctcagcagcgtggtgaccgt gccctccagcagcttgggcacgaaaacc tacacctgcaacgtagatcacaagcccag caacaccaaggtggacaagagagttgag tccaaatatggtcccctgccaccatgc ccagcacctgaggccgccggggacca tcagtcttctgttcccccaaacccaag</p>	<p>161</p>	<p>atggcctgggtgtggacctgctgttc ctgatggccgcccccagagcatcc aggccgagatcgtgctgaccagag ccccgccacctgagcctgagcccc ggcgagcgggcccacctgagctgc cgggccagccagagcgtgagcagc tacctggcctggtaccagcagaagcc cggccaggccccccggctgctgatc tacgacgccagcaaccgggccacc ggcatcccccccgggtcagcggca gcggcagcggcaccgacttcacct gaccatcagcagcctggagccgag gacttcgccgtgtactactgccagca gcggagcaactggcccctgaccttc ggccagggcaccaaggtggagatc aagcgtacgggtggctgcacatctgt cttcatctcccgccatctgatgagca gttgaaatctggaactgcctctgttgtg tgctgctgaataacttctatcccaga gaggccaaagtacagtgaaggtgg ataaccccctcaatcgggtaactcc caggagaggtgtcacagagcaggaca gcaaggacagcacctacagcctcag cagcacctgacgctgagcaagca gactacgagaacacaaagtctacg cctgcgaagtacccatcagggcctg agctcggccgtcacaagagctcaa caggggagagtg</p>	<p>162</p>

	gacactctcatgatctcccggaccctga ggtcacgtgcgtgggtggacgtgagc caggaagaccccagggtccagtcaact ggtacgtggatggcgtggagggtcataat gccaagacaagccgcggaggagca gttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcg tcctaccgtcctgcaccaggactggctg aacggcaaggagtacaagtgaaggtct ccaacaaaggcctcccgtcctccatcgag aaaaccatctcaaagccaaaggcagc cccgagagccacaggtgtaccctgcc cccatcccaggaggatgaccaagaac caggtcagcctgacctgctgtcaaagg cttctaccagcgacatcgccgtggagt gggagagcaatgggcagccggagaaca actacaagaccagcctcccgtgctggac tccgaggtccttctctctacagcagg ctaaccgtggacaagagcaggtggcagg aggggaatgtcttctcatgctccgtgatgc atgaggtctgcacaaccactacacag aagagcctctccctgtctctgggtaaa			
PSMB126 (FAB PSMB80)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGGTFDDYAIW VRQAPGQGLEWMGRIDPI EGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDRIYYDGVYW YSDYFDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEA	90	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	91

	<p>AGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLK</p>			
<p>PSMB124 (FAB PSMB56)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGGTFSSYAISWV RQAPGGLEWMGWISPN GNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDSDRSYNDYW GQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGGSFFLYSR</p>	92	<p>DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIGWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	93

	LTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSL GK			
PSMB123 (FAB PSMB55)	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIYPGD SDTRYSPSFQGVVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARGLPIWYLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	94	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVASDLA WYQQKPGQAPRLLIYF ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSITWPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	95
PSMB122 (FAB PSMB51)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYAIWV RQAPGQGLEWMGIIPYN GNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARVNSAALVWERL DYWGQGTLVTVSSASTKG	96	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP	83

	<p>PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVVTPSSSLGKTY TCNVDPKPSNTKVDKRV SKYGPCCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK</p>		<p>SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPBREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	
<p>PSMB121 (FAB PSMB49)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFG TANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARASRVWHASYGYLD YWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPCCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ</p>	97	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSKWLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRFTAPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLN NNFYPBREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLKADYE EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC</p>	98

	FNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLS LGK			
PSMB120 (FAB PSMB25)	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGHIYPGD SDTRYSPSFQGVVTTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARGWAYDRGLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG K	99	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQYYSTP LTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSLSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRG EC	100

PSMB119 (FAB PSMB18)	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGD SDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARAYHYSKGLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG K	101	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGGTDFLTITISLQ AEDVAVYYCQQYYSTP LTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRG EC	100
PSMB87 (FAB PSMB58)	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWISWV RQMPGKGLEWMGIIYPGD SYTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARDYEWELFDSRLDY WGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG	125	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGGT DFLTITISLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCCLLNNF YPREAKVQWKVDNAL	91

ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLS LGK	QSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYK HKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
---	--

Взаимодействия исходных мкАт PSMB123 (Fab PSMB55), PSMB127 (Fab PSMB83) и PSMB130 (Fab PSMB86) с ВКД PSMA человека, шимпанзе и яванского макака измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы ProteOn XPR36 (BioRad), как описано ранее для рекомбинантного ВКД PSMA шимпанзе. Сводные данные по аффинности связывания для каждого из этих мкАт с ВКД PSMA человека, шимпанзе и яванского макака показаны в табл. 18. Эти мкАт связываются с мишенями с аффинностями, сходными с биспецифическими антителами.

Таблица 18

Связывание моноклональных антител с рекомбинантным ВКД PSMA человека, шимпанзе и яванского макака по Proteon

	Человек KD (нМ)	Шимпанзе KD (нМ)	Яванский макак KD (нМ)
PSMB123 (Fab PSMB55)	9,03±1,20	14,3±3,33	66,7±8,60
PSMB127 (Fab PSMB83)	12,0±2,05	12,8±1,83	6,68±0,45
PSMB130 (Fab PSMB86)	29,6±2,43	31,7±7,48	> 300

Пример 3. Адаптация к человеческому каркасу антитела SP34 к CD3 Мышиное антитело SP34 к человеческому CD3 было гуманизировано способом адаптации к человеческому каркасу (Fransson, et al, JMB, 2010 398(2):214-31).

Последовательности VH и VL SP34 показаны на фиг. 4 ниже, причем остатки 1-215 легкой цепи и остатки 1-230 тяжелой цепи получены непосредственно из карты электронных плотностей, а остатки 231-455 получены из IGHG3_MOUSE (мышинный IgG3, изоформа 2).

VH SP34 (SEQ ID NO:128)

EVKLLLESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRS
 KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS
 WFAIWGQGTLVTVSA

VL SP34 (SEQ ID NO:129)

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTN
 KRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Четыре разные тяжелые цепи комбинируют с тремя разными легкими цепями, получив 12 гуманизированных вариантов.

Гуманизация SP34 и созревание аффинности.

Выбор человеческих зародышевых линий.

Для исследования выбрали матрицу из человеческих последовательностей переменных участков четырех тяжелых и трех легких цепей. Выбор человеческих последовательностей основывался исключительно на общем сходстве последовательностей с SP34 в каркасной области (FR). При отборе не учитывались ни последовательности CDR, ни их длина или канонические структуры.

Самыми близкими совпадениями для тяжелой цепи были человеческие зародышевые линии IGHV3-72 и IGHV3-73. Другая зародышевая линия, IGHV3-23, была выбрана из-за высокой частоты встречаемости в репертуаре человеческих В-клеток.

Самыми близкими совпадениями для легкой цепи были человеческие зародышевые линии IGLV7-43 (также известна как 7a), IGLV7-46 (также известна как 7b) и IGLV1-51 (также известна как 1b). IGLV7-46 является практически идентичной IGLV7-43, но имеет благоприятный признак присутствия Ala в положении 2, т.е. как в SP34.

В качестве J-областей были выбраны следующие: IGJH1 для тяжелой цепи; IGLJ3 для легкой цепи лямбда.

Обратные мутации.

Чтобы сохранить конформацию CDR-H3, необходимо было сохранить остатки в нескольких каркасных областях в VL, наиболее существенными из которых являются Val38, Gly48 и Gly51. Эти "обратные мутации" были добавлены в план гуманизации.

Asn в положении 57 тяжелой цепи в плане созревания был усечен до Gly, чтобы обеспечить необходимую гибкость и потенциально повысить стабильность (путем снижения связанного с неглициновым остатком локального структурного напряжения) без влияния на связывание.

При разработке плана гуманизации присутствовали еще несколько соображений. Во-первых, в человеческих зародышевых линиях IGLV7-46 и IGLV7-43 вводится остаток Trp в положении 59 с нежелательным окислительным потенциалом. В двух других зародышевых линиях в этом положении находится Gly, что соответствует мышинной последовательности. Следовательно, в обоих вариантах IGLV7-46 и IGLV7-43 сохранили Gly59. Наконец, Ala в положении 49 в VH может быть важным. Также на связывание с антигеном может влиять остаток в положении 99 (Val в SP34). Для проверки этих положений в некоторых вариантах были введены обратные мутации (фиг. 5).

Матрица HFA.

Матрица адаптации для человеческого каркаса (HFA) (табл. 8) состоит из четырех вариантов VH и трех вариантов VL (фиг. 5). Для целей HFA используется определение CDR от AbM (K.R. Abhinandan and A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839).

Варианты VH:

CD3H141 (SEQ ID NO:104): IGHV3-72*01 с мышинными CDR+Gly49Ala

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNTATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSS

CD3H142 (SEQ ID NO:102): IGHV3-23*01 с мышинными CDR+Ser49Ala

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNTATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNFGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSS

**CD3H143 (SEQ ID NO:115): IGHV3-23*01 с мышинными CDR+Ser49Ala,
Ala99Val**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNTATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNFGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSS

CD3H144 (SEQ ID NO:116): IGHV3-73*01 с мышинными CDR+Asn57Gly

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRS
KYNNTATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSS

Варианты VL:

**CD3L63 (SEQ ID NO:103): IGLV7-46*01 с мышинными CDR+F38V, A48G, Y51G,
W59G**

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L64 (SEQ ID NO:117): IGLV1-51*01 с мышинными CDR+Y38V, L48G, Y51G

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCRSSTGAVTTSNYANWVQQLPGTAPKGLIGGTNK
RAPGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

**CD3L66 (SEQ ID NO:105): IGLV7-43*01 с мышинными CDR+F38V, A48G, Y51G,
W59G**

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Матрица тяжелых и легких цепей CD3
(Все были получены с использованием IgG1-AA Fc,
содержащего L234A, L235A и F405L)

	CD3L63 (LV7-46/W59G) SEQ ID NO: 103	CD3L64 (LV1-51) SEQ ID NO: 117	CD3L66 (LV7-43/W59G) SEQ ID NO: 105
CD3H141 (HV3-72+ G49A) SEQ ID NO: 104	CD3B143	CD3B144	CD3B146
CD3H142 (HV3-23+ S49A) SEQ ID NO: 102	CD3B147	CD3B148	CD3B150
CD3H143 (HV3-23 +S49A, A99V) SEQ ID NO: 115	CD3B151	CD3B152	CD3B154
CD3H144 (VH3-73 с G49) SEQ ID NO: 116	CD3B155	CD3B156	CD3B158

Аминокислотные последовательности подвергли обратной трансляции в ДНК и методами генного синтеза получили кДНК (патент США № 6,670,127; патент США № 6,521,427). Варибельные области тяжелых цепей (HC) субклонировали на человеческий IgG1-AA Fc, содержащий мутации L234A, L235A и F405L, с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Варибельные области легких цепей (LC) субклонировали на человеческие константные области лямбда (λ) с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Полученные плазмиды трансфицировали в клетки Expi293F (Invitrogen) и выполняли экспрессию mAb. Очистку выполняли стандартными способами на колонке с белком A (колонка hiTrap MAbSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2. Последовательности VH и VL антител показаны в табл. 9.

Последовательности VH и VL антител к CD3

мкАт	НС	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	LC	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
CD3B 143	CD3H1 41	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	104	CD3L 63	QAVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	103
CD3B 144	CD3H1 41	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	104	CD3L 64	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISCRSSTG AVTTSNYANWVQ QLPGTAPKGLIGG TNKRAPGIPDRFSG SKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCAL WYSNLWVFGGGT KLTVL	117
CD3B 146	CD3H1 41	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	104	CD3L 66	QTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	105
CD3B 147	CD3H1 42	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CAKHGNGFGNSYVS	102	CD3L 63	QAVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG	103

		WFAYWGQGLTVTV SS			GTKLTVL	
CD3B 148	CD3H1 42	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CAKHG NFGNSYVS WFAYWGQGLTVTV SS	102	CD3L 64	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISCRSSTG AVTTSNYANWVQ QLPGTAPKGLIGG TNKRAPGIPDRFSG SKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCAL WYSNLWVFGGGT KLTVL	117
CD3B 150	CD3H1 42	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CAKHG NFGNSYVS WFAYWGQGLTVTV SS	102	CD3L 66	QTVVTQEPLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	105
CD3B 151	CD3H1 43	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CVKHG NFGNSYVS WFAYWGQGLTVTV SS	115	CD3L 63	QAVVTQEPLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	103
CD3B 152	CD3H1 43	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG	115	CD3L 64	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISCRSSTG AVTTSNYANWVQ	117

		KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CVKHG NFGNSYVS WFAYWGQGLVTV SS			QLPGTAPKGLIGG TNKRAPGIPDRFSG SKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCAL WYSNLWVFGGGT KLTVL	
CD3B 154	CD3H1 43	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYY CVKHG NFGNSYVS WFAYWGQGLVTV SS	115	CD3L 66	QTVVTQEPLTVS PGGTVTLTCSRST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	105
CD3B 155	CD3H1 44	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF AYWGQGLVTVSS	116	CD3L 63	QAVVTQEPLTVS PGGTVTLTCSRST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	103
CD3B 156	CD3H1 44	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF AYWGQGLVTVSS	116	CD3L 64	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISCRSSTG AVTTSNYANWVQ QLPGTAPKGLIGG TNKRAPGIPDRFSG SKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCAL WYSNLWVFGGGT KLTVL	117

CD3B 158	CD3H1 44	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	116	CD3L 66	QTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIG GTNKRAPGTPARF SGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGG GTKLTVL	105
-------------	-------------	---	-----	------------	---	-----

Пример 4. Эндогенное клеточное связывание гуманизированных хитов антител к CD3 с первичными Т-клетками.

Полученную панель антител к CD3 протестировали на связывание с CD3ε клеточной поверхности на первичных человеческих Т-клетках. Для этого связывание антител из экспрессионных супернатантов визуализировали с использованием поликлонального вторичного антитела к иммуноглобулину человека и анализировали методом проточной цитометрии. Коротко, связывание антител к CD3 с CD3ε на клеточной поверхности анализировали методом проточной цитометрии с использованием человеческих Т-лимфоцитов, очищенных отрицательной селекцией (Biological Specialty, Colmar, USA). Экспрессионные супернатанты или очищенные антитела нормализовали к 10 мкг/мл в среде или в буферном растворе для FACS (BD BioSciences) соответственно. Аликвоты по 2×10^5 клеток вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета (CoStar) для мечения. Антитела в экспрессионном супернатанте добавляли к клеткам и инкубировали в течение 45 мин при 4°C. После центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 мин и удаления супернатанта, 50 мкл вторичного антитела к IgG человека (H+L) Alexa Fluor 647 (Life technologies Inc.) инкубировали с клетками в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4°C в месте, защищенном от прямого света. Затем промывали и ресуспендировали в 30 мкл буферного раствора для FACS (BD BioSciences). Сбор образцов выполняли в системе Intellicyt HTFC с использованием программного обеспечения ForeCyt. Перед анализом связывания проводили селекцию жизнеспособных одиночных клеток, используя зеленый или красный фиксируемый краситель для живых/мертвых клеток (Life Technologies Inc.) и параметры площади и высоты для прямого/бокового рассеяния соответственно. Графики получали в программном обеспечении GraphPad Prism версии 5, используя значения средней интенсивности флуоресценции.

Хотя была выполнена серия титрований, на фиг. 6 для ясности представлена промежуточная концентрация. В качестве контролей использовали два полученных с использованием фагов терапевтических антитела собственной разработки с одинаковой областью Fc: G11 (HC SEQ ID NO: 118, LC SEQ ID NO: 119), не относящееся к яванскому макаку перекрестно-реагирующее агонистическое антитело использовали в качестве положительного контроля, а CD3B94 (HC-SEQ ID NO: 120, LC - SEQ ID NO: 121) использовали несвязывающее/неагонистическое антитело для оценки неспецифического связывания. Коммерческое антитело SP34 в этом исследовании для сравнения не использовали, поскольку это мышинное антитело, и использование другого вторичного детектирующего реагента не позволило бы напрямую сравнивать исследуемые варианты.

Данные продемонстрировали матрицу потенциала связывания в панели гуманизированных хитов антител к CD3, где два антитела (CD3B144, CD3B152) продемонстрировали полную потерю связывания с человеческими Т-клетками. Остальные антитела продемонстрировали некоторый диапазон потенциала связывания, который в широком смысле можно разделить на сильно связывающиеся и слабо связывающиеся, используя в качестве порога связывание антитела G11. По этим параметрам в панели вариантов были идентифицированы семь сильно связывающихся и семь слабо связывающихся антител (фиг. 6).

Затем проводили анализ связывания хитов антител к CD3 с первичными Т-клетками CD4 яванского макака, чтобы оценить сохранение перекрестной реактивности. Использовали очищенные Т-клетки CD4⁺ из периферической крови яванского макака (Zen Bio, Triangle Research Park, США). Протоколы исследований были сходными с описанными выше. Поскольку антитело G11 не обладает перекрестной реактивностью к CD3ε яванского макака, в качестве положительного контроля в данном анализе использовали CD3B124, химерное антитело собственной разработки, полученное из SP34, имеющее VH и VL от SP34, мышинный каркас и Fc человеческого IgG1 (фиг. 7). Интересно, что несколько вариантов продемонстрировали сниженный потенциал связывания по сравнению с наблюдаемым на человеческих клетках. Сюда относились сильно связывающиеся антитела CD3B150, CD3B151 и CD3B154, у которых связывание было снижено, и несколько слабо связывающихся антител, у которых связывание выше фонового более не определялось. Такая утрата связывания не была связана с какой-то конкретной цепью иммуноглобулина, и это может означать, что в потере перекрестной реактивности играет роль комбинация тяжелой и легкой

цепей. В сочетании эти анализы позволили идентифицировать варианты, сохраняющие перекрестную реактивность к CD3ε человека и яванского макака.

Пример 5. Функциональный анализ гуманизированных хитов антител к CD3 в первичных Т-клетках.

Анализ связывания показал, что панель хитов антител к CD3 демонстрирует некоторый диапазон связываний с Т-клетками человека и яванского макака. Чтобы исследовать способность каждого варианта к индукции активации через перекрестное связывание с CD3ε, первичные Т-клетки культивировали в течение ночи в присутствии антитела, конъюгированного с гранулами. На следующий день клетки собирали и метили антителом к CD69 для измерения активации (фиг. 8). Гуманизированные антитела к CD3 связывали с покрытыми белком А магнитными гранулами (SpheroTech, г. Лейк Форест, США) путем инкубации в течение ночи с антителом в концентрации 10 мкг/мл. На следующий день высевали по 2×10^5 первичных человеческих Т-клеток на круглодонные культуральные планшеты в трех повторах и добавляли по 2×10^5 гранул с покрытием. После инкубации в течение ночи при 37°C клетки собирали и метили антителом к CD69 Alexa Fluor® 488 (клон FN50; Biolegend) для оценки повышения уровня этого маркера активации. Сбор образцов и анализ проводили, как описано выше применительно к связыванию. Использовали несколько отрицательных контролей, в том числе только Т-клетки, Т-клетки с гранулами без покрытия и Т-клетки с гранулами, покрытыми изотипическим контролем (CD3B94). Все эти контроли демонстрировали сходные значения средней интенсивности флуоресценции, сопоставимые с неокрашенными Т-клетками, и это означает, что фон в данном анализе был низким. Для сравнения использовали несколько положительных контролей, включая ОКТ3 (US 5929212) и коммерческие антитела SP34-2.

Гуманизированные хиты антител к CD3 далее тестировали на способность активировать первичные Т-клетки CD4+ яванского макака (Zen Bio, Triangle Research Park, США) в том же анализе (фиг. 9). Антитело FN50 к CD69 описано как перекрестно-реагирующее с нечеловеческим белком, и, следовательно, его можно использовать для проверки активации этих клеток.

Данные об активации у человека и яванского макака коррелировали с данными о связывании в том, что панель хитов продемонстрировала некоторый диапазон потенциалов активации. Ряд молекул с сильным связыванием продемонстрировал способность активировать человеческие Т-клетки в равной или большей степени по сравнению с коммерческими антителами SP34-2. Несколько вариантов продемонстрировали потенциал активации более низкий, чем у SP34-2, а некоторые связывающиеся антитела не проявили признаков стимуляции CD69. Неспособность к активации наблюдалась только у вариантов, не проявлявших или проявлявших слабое связывание, а все варианты с сильным связыванием проявили какой-либо уровень активации, что указывает на корреляцию между связыванием и потенциалом активации как в случае человека (фиг. 10A), так и в случае яванского макака (фиг. 10B).

Для получения биспецифических антител с PSMA-специфическими антителами отобрали два антитела к CD3, CD3B146 и CD3B147, с высокой и средней аффинностью соответственно. Эти два антитела к CD3 получали в формате IgG4 PAA GenMab (Labriijn et al, 2013), в котором нацеливающее исходное мкАт (PSMA) содержит мутацию 409R GenMab (нативную аминокислоту для IgG4), а уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит F405L GenMab и мутацию R409K. Моноспецифическое антитело к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в областях Fc. Варибельные области тяжелых цепей (HC) субклонировали на человеческий IgG4-PAA Fc, содержащий мутации S228P, F234A, L235A, F405L и R409K, с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Варибельные области легких цепей (LC) субклонировали на человеческие константные области лямбда (λ) с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Полученные плазмиды трансфицировали в клетки Expi293F (Invitrogen) и выполняли экспрессию mAb. Антитела к CD3 очищали стандартными способами очистки с применением колонки с белком А с элюирующим буфером с 100 mM NaAc, pH 3,5, а также нейтрализующим буфером с 2 M Tris pH 7,5 и 150 mM NaCl. мкАт обезсоливали с использованием колонки PD10 (Sephadex G25M), и пулы диализовали в D-PBS при pH 7,2.

Было создано моноспецифическое антитело к CD3 CD3B217, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 102 и VL с SEQ ID NO: 103, и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. CD3B217 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 108 и легкую цепь с SEQ ID NO: 109. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 CD3B219, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105, и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. CD3B219 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 110 и легкую цепь с SEQ ID NO: 111.

Пример 6. Получение биспецифических антител к PSMA x CD3.

Для получения биспецифических антител к PSMA x CD3 требуются два исходных мкАт, одно - специфическое к нацеливающему плечу (например, PSMA), а другое - специфическое к эффекторному плечу (например, CD3). мкАт PSMA рекомбинировали со среднеаффинными плечами CD3B217 (VH SEQ ID NO: 102, VL SEQ ID NO: 103) и высокоаффинными CD3 плечами CD3B219 (VH SEQ ID NO: 104, VL SEQ ID NO: 105). Эти исходные мкАт находятся в формате GenMab (Labriijn et al, 2013), в котором

нацеливающее исходное мкАт (PSMA) содержит мутацию 409R GenMab (нативную аминокислоту для IgG4), а уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L GenMab и мутацию R409K. Моноспецифическое антитело к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в областях Fc. Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях НЕК под контролем промоторов CMV.

Исходные антитела PSMA и CD3 очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером с 100 мМ NaAc, pH 3,5, а также нейтрализующим буфером с 2 М Tris pH 7,5 и 150 мМ NaCl. мкАт обессоливали с использованием колонки PD10 (Sephadex G25M) и диализовали в буфере D-PBS при pH 7,2.

После очистки исходные антитела к PSMA смешивали с желаемым исходным антителом к CD3 в восстанавливающих условиях в 75 мМ цистеамин-HCl и инкубировали при 31°C в течение 4 ч. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, где заданное количество PSMA (например, 10 мг или ~ 67,8 наномолей) было объединено с антителом к CD3 (например, ~71,8 наномолей), при этом антитело к CD3 было добавлено при 6% избытке антитела к PSMA. Концентрации маточных растворов антител к PSMA варьировались от 0,8 до 6 мг/мл, а объемы реакционной смеси для рекомбинации изменялись для каждого спаривания. Затем продукты рекомбинации диализовали против PBS для удаления восстановителя. Реакции с биспецифическим антителом выполняли с избытком антитела к CD3 (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к PSMA, оставшегося после рекомбинации. После частичного восстановления исходных мкАт восстановитель удаляли посредством диализа в течение ночи в PBS.

Полученные конечные биспецифические антитела вместе с исходными мкАт (т.е. PSMA, CD3 или "Null" (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в табл. 10 а последовательности перечислены в табл. 11 и 12.

Отобранные подходящие антитела к PSMA также объединяли с неуничтожающим плечом ("Null") для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA (VH с SEQ ID NO: 106, VL с SEQ ID NO: 107) и комбинировали или с плечом к CD3 CD3B219-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3 X null), либо с плечами к PSMA, PSMB162, PSMB126, PSMB130 для получения PS3B37, PS3B39 и PS3B40, соответственно (PSMA×null).

Таблица 10

Полученные биспецифические антитела к PSMA x CD3

Биспецифическое антитело	ПЛЕЧО 1	SEQ ID NO:		ПЛЕЧО 2	SEQ ID NO: (VH; VL IgG4PAA F405L, R409K)	
		HC	LC		HC	LC
PS3B2	PSMB120 (FAB PSMB25)	99	100	CD3B217	108	109
PS3B3	PSMB121 (FAB PSMB49)	97	98	CD3B217	108	109
PS3B4	PSMB122 (FAB PSMB51)	96	83	CD3B217	108	109
PS3B5	PSMB123 (FAB PSMB55)	94	95	CD3B217	108	109

046641

PS3B7	PSMB87 (FAB PSMB58)	125	91	CD3B217	108	109
PS3B8	PSMB126 (FAB PSMB80)	90	91	CD3B217	108	109
PS3B9	PSMB127 (FAB PSMB83)	88	89	CD3B217	108	109
PS3B10	PSMB128 (FAB PSMB84)	86	87	CD3B217	108	109
PS3B11	PSMB129 (FAB PSMB109)	82	83	CD3B217	108	109
PS3B12	PSMB130 (FAB PSMB86)	84	85	CD3B217	108	109
PS3B19	PSMB119 (FAB PSMB18)	101	100	CD3B219	110	111
PS3B20	PSMB120 (FAB PSMB25)	99	100	CD3B219	110	111
PS3B21	PSMB121 (FAB PSMB49)	97	98	CD3B219	110	111
PS3B22	PSMB122 (FAB PSMB51)	96	83	CD3B219	110	111
PS3B23	PSMB123	94	95	CD3B219	110	111

	(FAB PSMB55)					
PS3B24	PSMB124 (FAB PSMB56)	92	93	CD3B219	110	111
PS3B25	PSMB87 (FAB PSMB58)	125	91	CD3B219	110	111
PS3B26	PSMB126 (FAB PSMB80)	90	91	CD3B219	110	111
PS3B27	PSMB127 (FAB PSMB83)	88	89	CD3B219	110	111
PS3B28	PSMB128 (FAB PSMB84)	86	87	CD3B219	110	111
PS3B29	PSMB129 (FAB PSMB109)	82	83	CD3B219	110	111
PS3B30	PSMB130 (FAB PSMB86)	84	85	CD3B219	110	111

Было создано моноспецифическое антитело к CD3 CD3B217, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 102 и VL с SEQ ID NO: 103, и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. CD3B217 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 108 и легкую цепь с SEQ ID NO: 109. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 CD3B219, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 104 и VL с SEQ ID NO: 105, и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. CD3B219 содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 110 и легкую цепь с SEQ ID NO: 111. В качестве контроля было создано моноспецифическое антитело к RSV, полученное из B21M, содержащее области VH и VL, имеющие VH и VL SEQ ID NO: 106 и VL SEQ ID NO: 107, и константную область IgG4 с S228P, F234A, L235A или F234A, L235A, R409K, F405L для партнера в качестве нулевого плеча либо с CD3, либо с PSMA биспецифического антитела.

Биспецифическое антитело PS3B2 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB120, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B3 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB121-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B4 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт I3RB122-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B5 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB123-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B7 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB58-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B8 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB126-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B9 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо мкАт PSMB127-R409, связывающееся с PSMA.

Биспецифическое антитело PS3B10 содержит плечо мкАт CD3B217-F405L, R409K, связывающееся

Последовательности биспецифических антител к PSMA x CD3

Ид. номер биспецифического Ат	Аминокислотные последовательности тяжелой цепи: Плечо к PSMA Плечо к CD3	SEQ ID NO	Аминокислотные последовательности легкой цепи: Плечо к PSMA Плечо к CD3	SEQ ID NO
PS3B2 (PSMB120 x CD3B217)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGSDT RYSPSFQGQVTISADKISTA YLQWSSLKASDTAMY YCA RGWAYDRGLDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDPHKPSNTKVD KRVESKYGPCCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLG K	99	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFLTISLQ AEDVAVYYCQYYSTP LTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRG EC	100

	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGFGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGK</p>	108	<p>QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TPPSKQSNKYYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	109
<p>PS3B3 (PSMB12 1 x CD3B217)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAR ASRVWHASYGYLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVP</p>	97	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSKWLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRFTAPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS</p>	98

<p>SSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>		<p>KDSTYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	
<p>EVQLLESQGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</p>	<p>108</p>	<p>QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	<p>109</p>

	WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
PS3B4 (PSMB12 2 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWIIPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVKRVESKYGPPCPPCAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFLLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG K	96	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	83
	EVQLLESQGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGFGNSYVSWFAY	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VLTCSRSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW	109

	<p>WGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHT QKLSLSLGLK</p>		<p>VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	
<p>PS3B5 (PSMB12 3 x CD3B217)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGSDT RYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCA RGLPIWYLDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVSVLTVLHQDWLN</p>	94	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVASDLA WYQQKPGQAPRLLIYF ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSITWPFQFGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC</p>	95

	GKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK			
	EVQLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	109
PS3B7 (PSMB87 x	EVQLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI	109

<p>CD3B217)</p>	<p>YATYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGNSYVSWFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEK TISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGLK</p>		<p>GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	
	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDSYT RYSPSFQGQVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCA RDYEWELFDSRLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM</p>	<p>125</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNGEC</p>	<p>91</p>

	<p>ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>			
<p>PS3B8 (PSMB12 6 x CD3B217)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFDDYAIWVR QAPGQGLEWMGRIDPIEGT ANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDNAVYYC ARDRIYYDGVYWYSDYFD YWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSV MHEALHNHYT</p>	90	<p>DIQMTQSPSSLSASVGD RVITICRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC</p>	91

	QKSLSLSLGK			
	EVQLLES GGGLVQP GGLSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGNSYVSWFAY WGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	109
PS3B9 (PSMB12 7 x CD3B217)	EVQLLES GGGLVQP GGLSLR LSCAASGFTFKSDAMHWVR QAPGKGLEWVSEISGSGGY TNYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSDYDSSLYVGDYFDYW GQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG	88	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD	89

	<p>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDPKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK</p>		<p>NALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	
	<p>EVQLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVKHGNGFNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDP HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK</p>	<p>108</p>	<p>QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	<p>109</p>

	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
PS3B10 (PSMB12 8 x CD3B217)	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFDSDWMSWVR QAPGKGLEWVSAISGNGGS TEYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPY YYYDGD SYYGMDV WGQGT LVT VSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	86	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	87
	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRAEDTAVY	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPE	109

	YCVKHGNGFGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGK		DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	
PS3B11 (P SMB12 9 x CD3B217)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGN ANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVNSAALVWERLDYWGQ GTLTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKT	82	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	83

	KPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNLFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK			
	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCYVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQEGNLFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	108	QAVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	109
PS3B12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK	84	EIVLTQSPGTLSPGER	85

(PSMB13 0 x CD3B217)	V S C K A S G G T F K S Y D I S W V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I E G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D Y P A G Y G F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K		A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P L T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	
	E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F N T Y A M N W V R Q A P G K G L E W V A R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K H G N F G N S Y V S W F A Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D	108	Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y A N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N L W V F G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L	109

	HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK		SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	
PS3B29 (PSMB12 9 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGN ANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVNSAALVWERLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLY	82	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC....	83

	SRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSL GK			
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	111
PS3B30 (PSMB13 0 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFKSYDISWVR QAPGQGLEWMGGIPIEGTA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCA RDYPAGYGFQYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS	84	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP	85

<p>TSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>		<p>PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	
<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPAPEAAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK</p>	<p>110</p>	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	<p>111</p>

	CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGLK			
PS3B28 (PSMB12 8 x CD3B219)	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSDWMSWVR QAPGKGLEWVSAISNGGGS TEYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPYVYDGDSDSYGMDV WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGLK	86	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNGEC	87
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN	110	QTVVTEPEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI	111

	<p>YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNGNSYVSWFAY WGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK</p>		<p>GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	
<p>PS3B27 (PSMB12 7 x CD3B219)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWVR QAPGKGLEWVSEISGSGGY TNYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD</p>	88	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	89

<p> TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK </p>			
<p> EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT </p>	<p>110</p>	<p> QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S </p>	<p>111</p>

	QKSLSLSLGK			
PS3B26 (PSMB12 6 x CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFDDYAIWVR QAPGQGLEWMGRIDPIEGT ANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDNAVYYC ARDRIYYDGVYWYSDYFD YWQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	90	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNGEC	91
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNGFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT	110	QTVVTEPEPLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLVSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT	111

	<p>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVKDRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGK</p>		<p>VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	
<p>PS3B25 (PSMB87 x CD3B219)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDSYT RYSPSFQGVQVTSADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCA RDYEWELFDSRLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVKDRVESKYGPPCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV</p>	<p>125</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFRSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNGEC</p>	<p>91</p>

	KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGK			
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGT VLTTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	111
PS3B24 (PSMB12 4 x CD3B219	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGN ANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSED TAVYYC	92	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIGWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT	93

)	<p>ARDSDRSYNLDYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDPKPSNTK VDKRVEKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>		<p>YYCQQSYSTPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC</p>	
	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFTNYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE</p>	110	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	111

	VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLGK			
PS3B23 (PSMB12 3 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGSDT RYSPSFQGQVTISADKISTA YLQWSSLKASDTAMYYCA RGLPIWYLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVTPSSSLGT KTYTCNVDPHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	94	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVASDLA WYQQKPGQAPRLLIYF ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQSITWPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	95
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR	110	QTVVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY	111

	<p>QAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK</p>		<p>ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	
<p>PS3B22 (PSMB12 3 x CD3B219)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWIIIPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDVAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCAP</p>	96	<p>DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSPRYPLTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS</p>	83

<p>EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>		<p>SPVTKSFNRGEC</p>	
<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ</p>	<p>110</p>	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	<p>111</p>

	EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
PS3B21 (PSMB12 1X, CD3B219)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDNAVYYCAR ASRVWHASYGYLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG K	97	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSKWLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAV YYCQQRFTAPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	98
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL	110	QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN	111

	VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGLK		KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	
PS3B20 (PSMB12 0 x CD3B219)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPKGLEWMGIIYPGDSDT RYSPSFQGVQVVISADKISTA YLQWSSLKASDTAMYYCA RGWAYDRGLDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYT	99	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQYYSTP LTFGGQTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDESTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRG EC	100

	LPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGK			
	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFLLYSLKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	110	QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S	111
PS3B19 (PSMB11 9 x CD3B219	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGSDT RYSFSFQGVVVISADKSISTA	101	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR	100

<p>)</p>	<p>YLQWSSLKASDTAMYYCA RAYHYSKGLDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPVYV LPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG K</p>		<p>FSGSGSGTDFLTISSLQ AEDVAVYYCQYYSTP LTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTL TLSKADYEEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRG EC</p>	
	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCARHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPPEVTCVVVD</p>	<p>110</p>	<p>QTVVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEC S</p>	<p>111</p>

VSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHT QKSLSLSLGK			
--	--	--	--

Таблица 12

Последовательности VH/VL биспецифических антител к PSMA x CD3

Биспецифическое антитело	ПЛЕЧО 1	SEQ ID NO:		ПЛЕЧО 2	SEQ ID NO: (VH; VL IgG4PAA F405L, R409K)	
		VH	VL		VH	VL
PS3B2	PSMB120 (FAB PSMB25)	77	78	CD3B217	102	103
PS3B3	PSMB121 (FAB PSMB49)	75	76	CD3B217	102	103
PS3B4	PSMB122 (FAB PSMB51)	74	61	CD3B217	102	103
PS3B5	PSMB123 (FAB PSMB55)	75	76	CD3B217	102	103
PS3B7	PSMB87 (FAB PSMB58)	160	64	CD3B217	102	103
PS3B8	PSMB126	68	69	CD3B217	102	103

	(FAB PSMB80)					
PS3B9	PSMB127 (FAB PSMB83)	66	67	CD3B217	102	103
PS3B10	PSMB128 (FAB PSMB84)	64	65	CD3B217	102	103
PS3B11	PSMB129 (FAB PSMB109)	60	61	CD3B217	102	103
PS3B12	PSMB130 (FAB PSMB86)	62	63	CD3B217	102	103
PS3B19	PSMB119 (FAB PSMB18)	79	78	CD3B219	104	105
PS3B20	PSMB120 (FAB PSMB25)	77	178	CD3B219	104	105
PS3B21	PSMB121 (FAB PSMB49)	75	76	CD3B219	104	105
PS3B22	PSMB122 (FAB PSMB51)	74	61	CD3B219	104	105
PS3B23	PSMB123 (FAB PSMB55)	75	76	CD3B219	104	105
PS3B24	PSMB124 (FAB	70	71	CD3B219	104	105

	PSMB56)					
PS3B25	PSMB87 (FAB PSMB58)	160	65	CD3B219	104	105
PS3B26	PSMB126 (FAB PSMB80)	68	69	CD3B219	104	105
PS3B27	PSMB127 (FAB PSMB83)	66	67	CD3B219	104	105
PS3B28	PSMB128 (FAB PSMB84)	64	65	CD3B219	104	105
PS3B29	PSMB129 (FAB PSMB109)	60	61	CD3B219	104	105
PS3B30	PSMB130 (FAB PSMB86)	62	63	CD3B219	104	105

Пример 7. Характеризация по связыванию с клетками.

Биспецифические антитела к PSMA x CD3 исследовали на связывание с PSMA-положительными клеточными линиями LNCaP, человеческими PSMA-НЕК, PSMA-НЕК шимпанзе и PSMA-НЕК яванского макака. Для оценки возможностей связывания биспецифических антител к PSMA использовали анализ связывания клеток (описанный ранее). Вкратце, PSMA-экспрессирующие опухолевые клетки связываются биспецифическими антителами в известных концентрациях, а связанное антитело обнаруживают с помощью реагента обнаружения легкой каппа-цепи человека, конъюгированного с PE (Invitrogen). Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) представляет собой меру связанного биспецифического антитела. СИФ преобразуется в относительный EC_{50} . EC_{50} представляет собой широко используемую кривую зависимости эффекта от дозы, где полумаксимальная эффективная концентрация или точка EC_{50} определяется как точка перегиба кривой. EC_{50} определяли путем измерения биспецифических и известных концентраций, связанных с клетками. Высокие концентрации приводили к максимальному связыванию целевого антигена, т. е. полному насыщению связывания. Затем кривые доза-ответ разводили до фонового значения или до полного отсутствия биспецифического связывания. Точка перегиба кривой отражает точку EC_{50} . Вычисленный EC_{50} определяют, взяв количество биспецифического антитела в точке EC_{50} мкг/мл и превращая его в значение молярности на основе молекулярной массы биспецифического антитела. Биспецифические антитела нормализовали по концентрации белка, а затем инкубировали с таким же количеством клеток, экспрессирующих PSMA человека или яванского макака. СИФ для каждой концентрации получали с помощью проточной цитометрии и наносили на график в виде функции от концентрации. Данные преобразовывали с помощью \log_{10} и затем наносили на график. Для определения EC_{50} строили кривые связывания методом нелинейной регрессии. Эти относительные значения использовали для ранжирования связывания PSMA с целевыми клетками. В табл. 12 приведены относительные значения связывания EC_{50} для исследований связывания цельных клеток с использованием клеточных линий, экспрессирующих PSMA LNCaP, яванского макака и шимпанзе.

На фиг. 11 показано связывание всех полученных биспецифических антител с LNCaP. Данные о связывании указывают на то, что наблюдаются 3 популяции связывания: 1) сильное связывание, 2) среднее связывание и 3) слабое связывание/отсутствие связывания. Биспецифические антитела к PSMA x нулевое плечо сохраняют связывание с клетками LNCaP (фиг. 11 E), но для биспецифических антител к нулевому плечу x CD3 не наблюдается связывания (фиг. 11 F). Среднеаффинные и высокоаффинные биспецифические антитела к CD3 с одним и тем же плечом PSMA связываются аналогичным образом. В остальных анализах для оценки активности связывания с PSMA-НЕК шимпанзе (фиг. 12), PSMA яван-

ского макака (фиг. 13), PSMA-НЕК человека (фиг. 14) или исходного НЕК293 (данные не показаны) использовали только биспецифические антитела, которые представляли собой положительные связывающиеся с LNCaP. Для каждой клеточной линии тестировали связывание с CD3 с высокой или средней аффинностью. Данные о связывании PSMA-НЕК человека указывают на возможное незначительное различие между LNCaP и данной клеточной линией; однако один и тот же общий порядок связывания очевиден. PS3B19, полученный посредством пэннинга LNCaP, по-видимому, сильно связывается с клетками PSMA-НЕК человека. Биспецифические антитела демонстрируют широкий диапазон профилей связывания на PSMA-НЕК человека. Интересно, что совпадения, полученные методом пэннинга на клеточной линии PSMA шимпанзе, имеют более сильный профиль связывания, тогда как соединения, полученные методом пэннинга на линии LNCaP, демонстрируют более слабое связывание. В этом эксперименте с исходными клетками НЕК не наблюдалось связывания (данные не показаны).

После рекомбинации в биспецифические антитела несколько клонов постоянно превосходят другие и связывают перекрестные виды. Эти биспецифические антитела представляют собой PS3B21, PS3B22, PS3B26, PS3B27, PS3B28 и PS3B30, соответствующие мкАт PSMB121, PSMB122, PSMB126, PSMB127, PSMB128 и PSMB130. Клеточное связывание EC_{50} и расчетные EC_{50} показаны в табл. 13.

Таблица 13

Клеточное связывание EC_{50}

bsAb	LNCaP		Яванский макак		Шимпанзе	
	EC_{50} (мкг/мл)	Расчетный EC_{50} (нМ)	EC_{50} (мкг/мл)	Расчетный EC_{50} (нМ)	EC_{50} (мкг/мл)	Расчетный EC_{50} (нМ)
PS3B19	слишком слабый	Н/П	1,757	12,4	5,10	35,93
PS3B20	122,7	864,1	2,003	14,1	3,33	23,44
PS3B21	0,7368	5,2	0,8604	6,1	1,25	8,81
PS3B22	2,603	18,3	1,137	8	3,02	21,23
PS3B23	слишком слабый	Н/П	3,744	26,4	0,88	6,18
PS3B24	слишком слабый	Н/П	18,22	128,3	1,10	7,75
PS3B26	0,07147	0,5	0,3706	2,6	0,05	0,34
PS3B27	2,07	14,6	1,403	9,9	3,24	22,83
PS3B28	1,157	8,1	0,6879	4,8	1,01	7,08
PS3B29	7,766	54,7	2,539	17,9	4,11	28,93
PS3B30	1,203	8,5	5,37	37,8	3,29	23,19

Все биспецифические антитела сохраняли способность связываться с PSMA-положительными клеточными линиями. Некоторые из антител хорошо связывались с клетками шимпанзе и экспрессией PSMA яванского макака, но лишь слабо связывались с клетками LNCaP. Связывающиеся с LNCaP EC_{50} находились в диапазоне от 0,5 нМ до 864 нМ, тогда как экспрессирующие PSMA яванского макака EC_{50} находились в диапазоне от 0,9 до 128 нМ, а связывающиеся PSMA с НЕК шимпанзе находились в диапазоне 36-0,3 нМ (табл. 12). На основании клеточного связывания EC_{50} несколько биспецифических антител к PSMA соответствовали критериям 20 нМ или более сильного связывания с PSMA человека и 50 нМ или более сильного связывания с PSMA яванского макака.

Пример 8. Аффинная характеристика по Proteon и Biacore.

Для дополнительной оценки антител измеряли скорости ассоциации и диссоциации с PSMA шимпанзе для совпадений, которые были получены при анализах связывания с клетками. Взаимодействия биспецифических мкАт к PSMA x CD3 с мишенью (рекомбинантный шимпанзе, PSMA) исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Биосенсорную поверхность готовили путем связывания антитела к Fc человеческого IgG (Jackson

ImmunoResearch Laboratory кат. № 109-005-098) с модифицированным слоем альгинатного полимера поверхностью чипа GLC (BioRad, кат. № 176-5011) с использованием инструкций производителя по проведению химической реакции аминного сочетания. Примерно 4400 единиц (RU) антител к человеческому IgG Fc были иммобилизованы. Кинетические эксперименты выполняли при 25°C в подвижном буферном растворе (DPBS+0,03% полисорбат P20+100 мкг/мл BSA). Для выполнения кинетических экспериментов захватывали 100 RU биспецифических антител, с последующим выполнением инъекций аналитов (рекомбинантный ВКД PSMA шимпанзе) с концентрациями в диапазоне от 3,7 нМ до 300 нМ (в 3-кратном последовательном разведении). Фазу ассоциации отслеживали в течение 3 минут при 50 мкл/мин с последующим 15-минутным пропуском потока буферного раствора (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными импульсами 100 мМ фосфорной кислоты (H₃PO₄ Sigma, кат. № 7961) при 100 мкл/мин.

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ProteOn Manager. Сначала корректировали данные по отношению к фону, используя промежуточные участки. Впоследствии выполняли двойное вычитание эталона данных посредством введения буферного раствора вместо введения аналитов. Кинетический анализ данных выполняли, используя модель связывания Ленгмюра 1:1. Результат для каждого биспецифического антитела регистрировали в формате k_a (скорость ассоциации), k_d (скорость диссоциации) и K_D (равновесная константа диссоциации). Результаты приведены в табл. 14-18.

Результаты.

Табл. 14. Сводные данные по кинетике и аффинности связывания PS3B25 и PS3B27 с рекомбинантным PSMA человека (3,7-300 нМ). Параметры, указанные в этой таблице, были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, $K_D=k_d/k_a$.

Таблица 14

также называется	Ид. номер белка биспецифического Аг	k_a (1/М*с) 10 ⁵	k_d (1/с) 10 ⁻⁰³	K_D (нМ)
PSMB87 x CD3B219	PS3B25	1,88±0,13	1,01±0,05	5,38±0,55
PSMB127 x CD3B219	PS3B27	2,87±0,36	2,89±0,70	10,3±3,2

n=3 независимых эксперимента с 2 повторениями

Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Табл. 15. Сводные данные по кинетике и аффинности связывания PS3B25 и PS3B27 с рекомбинантным PSMA шимпанзе (3,7-300 нМ). Параметры, указанные в этой таблице, были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, $K_D=k_d/k_a$.

Таблица 15

также называется	Ид. номер белка биспецифического Аг	k_a (1/М*с) 10 ⁵	k_d (1/с) 10 ⁻⁰³	K_D (нМ)
PSMB87 x CD3B219	PS3B25	2,81±0,08	0,99±0,04	3,54±0,25
PSMB127 x CD3B219	PS3B27	2,08±0,38	1,56±0,37	7,48±0,97

n=3 независимых эксперимента с 2 повторениями

Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Табл. 16. Сводные данные по кинетике и аффинности связывания PS3B25 и PS3B27 с рекомбинантным PSMA яванского макака (3,7-300 нМ). Параметры, указанные в этой таблице, были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, $K_D=k_d/k_a$.

Таблица 16

также называется	Ид. номер белка биспецифического Аг	k_a (1/М*с) 10 ⁵	k_d (1/с) 10 ⁻⁰³	K_D (нМ)
PSMB87 x CD3B219	PS3B25	0,98±0,04	7,97±0,34	81,1±3,3
PSMB127 x CD3B219	PS3B27	1,59±0,12	1,10±0,04	7,00±0,68

n=3 независимых эксперимента с 2 повторениями

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Табл. 17. Сравнение аффинности связывания PS3B25 и PS3B27 человека, шимпанзе и яванского макака. Аффинность, $K_D = k_d/k_a$.

Таблица 17

Образец	K_D (нМ) человека	K_D (нМ) шимпанзе	K_D (нМ) яванского макака
PS3B25	5,38 \pm 0,55	3,54 \pm 0,25	81,1 \pm 3,3
PS3B27	10,3 \pm 3,2	7,48 \pm 0,97	7,00 \pm 0,68

Табл. 18. Сводные данные по кинетике и аффинности связывания биспецифических мкАт с рекомбинантным PSMA шимпанзе (3,7-300 нМ). Параметры, указанные в этой таблице, были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, $K_D = k_d/k_a$.

Таблица 18

Ид. номер белка биспецифического Ат	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
PS3B19	1,26E+04	2,98E-04	23,6
PS3B20	1,76E+04	3,78E-04	21,4
PS3B21	6,70E+04	4,73E-04	7,1
PS3B22	6,51E+04	1,24E-03	19
PS3B23	9,89E+05	1,76E-03	1,8
PS3B24	6,26E+03	2,52E-04	40,3
PS3B25	1,95E+05	1,06E-03	5,5
PS3B26			Нет связывания
PS3B27	1,70E+05	1,76E-03	10,4
PS3B28	1,34E+05	2,33E-03	17,4
PS3B29	6,71E+04	6,80E-03	101
PS3B30	7,34E+04	1,65E-03	22,4
PS3B31			Нет связывания
PS3B32			Нет связывания
PS3B33			Нет связывания
PS3B34			Нет связывания
PSMA нуль			Нет связывания

По большей части связывание с белком параллельно связыванию с клетками. Однако одно из биспецифических антител не демонстрировало связывания с рекомбинантным ВКД PSMA шимпанзе, хотя он связывался с PSMA шимпанзе, экспрессированным на клеточной поверхности клеток НЕК. Это антитело PS3B26 представляет собой связующее вещество, содержащее только клетку, и его отбраковывали из последующих экспериментов по связыванию. Одно из положительных связывающих веществ, PS3B23, демонстрировало двухфазное связывание и не соответствовало модели связывания 1:1. Десять биспецифических антител были положительными по связыванию с рекомбинантным ВКД PSMA шимпанзе при помощи Proteon, и их аффинность дополнительно профилирована при помощи BIACORE.

Связывание с рекомбинантным PSMA шимпанзе посредством Biacore. Измерения аффинности с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) выполняли с помощью оптического биосенсора Biacore 3000 (Biacore-GE Healthcare). Биосенсорную поверхность готовили путем связывания антитела к Fc человеческого IgG (Jackson кат. № 109-005-098) с карбоксиметилированным декстраном на поверхности чипа CM-5 (BioRad, кат. № BR-1000-12) с использованием инструкций производителя по проведению химической реакции аминного сочетания. Примерно 16 000 единиц (RU) антител к человеческому IgG Fc были иммобилизованы в каждой из четырех проточных ячеек. Кинетические эксперименты выполняли при +25°C в подвижном буферном растворе (DPBS+0,03% полисорбат P20+100 мкг/мл BSA). В подвижном буфере готовили разведения антигена (рекомбинантный PSMA шимпанзе, концентрация 1,2-300 нМ или 3,7-900 нМ в 3-кратном последовательном разведении). Около 100 RU биспецифических мкАт к PSMA x CD3 было захвачено в проточной ячейке со 2 по 4 сенсорный чип. Проточную ячейку 1 использовали в качестве эталона. После захвата PSMA x CD3 проводили 3-5-минутную инъекцию (фаза ассоциации) антигена (рекомбинантного PSMA шимпанзе) со скоростью 50 мкл/мин, затем - 15 или 20-минутную инъекцию проточного буфера (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными инъекциями 100 мМ фосфорной кислоты (H₃PO₄ Sigma, кат. № 7961) при 50 мкл/мин.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы оценки BIAevaluation software (Biacore). Во-первых, проводили двойное эталонное вычитание данных, вычитая графики, полученные при инъекции буфера, из эталонных графиков, полученных при инъекциях анализируемых веществ. Затем проводили кинетический анализ данных с помощью лэнгмюровской модели связывания 1:1 с точным соответствием. Результат для каждого PSMAxCD3 биспецифического мкАт регистрировали в формате k_a (скорость ассоциации), k_d (скорость диссоциации) и K_D (равновесная константа диссоциации).

Таблица 19

Сводные данные по кинетике и аффинности связывания биспецифических мкАт с рекомбинантным ВКД PSMA шимпанзе при помощи Biacore.

	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
PS3B19	6,24E+03	4,14E-04	66,3
PS3B20	7,82E+03	4,61E-04	59,1
PS3B21	1,10E+04	4,89E-04	44,4
PS3B22	1,66E+04	1,00E-03	60,4
PS3B23	1,34E+05	1,22E-03	9,1
PS3B24	2,35E+04	9,07E-04	38,6
PS3B25	6,59E+04	1,08E-03	16,4
PS3B27	8,90E+04	2,00E-03	22,4
PS3B28	6,20E+04	1,91E-03	30,8
PS3B29	2,74E+04	1,59E-03	58,1
PS3B30	3,48E+04	1,82E-03	52,3

Все биспецифические антитела, которые связываются с ВКД PSMA шимпанзе при помощи Proteon, также связываются при помощи Biacore. Аффинности связывания были несколько слабее при использовании Biacore.

Пример 9. Оценка биспецифических антител PSMA x CD3 в анализе функционального уничтожения клеток.

Анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности использовали для функционального скрининга активности биспецифических антител. Биспецифические антитела тестировали на способность лизировать клетки НЕК со сверхэкспрессией PSMA человека, а также клеточную линию рака предстательной железы человека LNCAP. Кроме того, биспецифические антитела тестировали на способность уничтожать клетки НЕК PSMA яванского макака для подтверждения перекрестной реактивности с видами.

Для измерения цитотоксичности отдельных биспецифических антител использовали анализ высвобождения хрома-51. Цитотоксичность измеряют по количеству высвобождаемого хрома в культуральную среду в результате лизиса клеток в присутствии активированных Т-клеток. Величину высвобождения сравнивают со спонтанным высвобождением хрома только в клетках-мишенях и максимальным высвобождением посредством общего лизиса клеток-мишеней при помощи Triton-X.

Человеческие пан-Т-клетки (CD3+) от нескольких доноров предварительно активировали в течение ночи в покрытых ОКТЗ колбах (1 мкг/мл) и IL-2 в концентрации 20 Ед/мл. Т-клетки промывали двукратно. Клетки-мишени метили в течение 1 ч хромом-51. Т-клетки и клетки-мишени культивировали в соотношении 5:1 в течение 18-24 ч, после чего собирали и анализировали супернатант культуры. Все точки анализировали в трех повторностях и регистрировали в виде среднего значения цитотоксичности для трех повторностей и СОС. Использовали разведения биспецифического антитела от 10 мкг/мл до 0,00001 мкг/мл.

На фиг. 15 показано опосредованное Т-клетками уничтожение всех биспецифических антител к PSMA x CD3 против клеток PSMA-НЕК человека. В этом эксперименте исследовали биспецифические антитела к CD3 со средней и высокой аффинностью. Уничтожение клеток очевидно для большинства молекул с высокоаффинными плечами CD3, при этом в наименьшей протестированной концентрации происходит уничтожение клеток. PS3B9 было единственным биспецифическим антителом со средней аффинностью, демонстрирующим значительное уничтожение клеток при более низких концентрациях. На фиг. 16 показано опосредованное Т-клетками уничтожение нескольких пар биспецифических антител. Из этих данных очевидно, что высокоаффинные биспецифические антитела, связывающиеся с CD3, генерируют наибольшее уничтожение клеток, и это было предметом дополнительных экспериментов по уничтожению клеток.

На фиг. 17 показаны данные по уничтожению клеток для биспецифических антител к PSMA x CD3 с высокоаффинным плечом CD3, созданным против клеток LNCAP. Все PS3B25, PS3B27, PS3B28, PS3B30, PS3B23 и PSB22 демонстрировали активность по перенаправлению Т-клеток. PS3B29 демонстрировало активность в отношении клетки PSMA-НЕК человека в самых высоких концентрациях, но не в отношении LNCAP, что указывает на то, что, поскольку оно является слабым связыванием с PSMA, оно не может хорошо связываться при низких уровнях экспрессии PSMA. Напротив, PS3B25, PS3B27 и PS3B28 продемонстрировали самый высокий лизис опухолевых клеток LNCAP. Биспецифическое антитело PS3B38, состоящее из PSMB125 и нулевого плеча против белка RSV, не имело цитолитической активности, как и ожидалось, из-за неспособности связываться с Т-клетками.

Для подтверждения функции перенаправления Т-клеток PSMA яванского макака биспецифические антитела тестировали на лизис клеток PSMA-НЕК яванского макака, как показано на фиг. 18. Все протестированные биспецифические антитела были способны уничтожать клетки, экспрессирующие PSMA яванского макака, при этом PS3B27 и PS3B28 имели самую высокую активность. Из предыдущих исследований связывания с клетками эти плечи к PSMA имели более высокую аффинность к PSMA яванского макака по сравнению с PSMA человека, и это наблюдение также было отражено в уничтожении клеточной линии НЕК и не лизировали родительскую клеточную линию НЕК (данные не показаны).

Для дополнительного анализа отбирали антитела к PSMA PSMB127 и PSMB130, которые продуцируют биспецифические антитела к PSMA x CD3 PS3B27 и PS3B30 соответственно. PS3B27 и PS3B30 убивали мишени PSMA и человека, и яванского макака и имели высокоаффинное плечо CD3. PS3B27 связывался с клеточными линиями, экспрессирующими человеческий PSMA, с по существу такими же EC50~14,6 нМ и ~ 9,9 нМ яванского макака. PS3B30 связывался с человеческим PSMA с примерно 5-6-кратным различием аффинности, при этом EC₅₀ составляет ~ 8-8,5 нМ, а PSMA яванского макака ~ 37,8-57 нМ. Хотя различие между связыванием с человеком и связыванием с яванским макаком может быть более чем в 5 раз, PS3B27 показало функциональное уничтожение мишеней как человека, так и яванского макака.

Повторяли взаимодействия PS3B27 с рекомбинантным ВКД PSMA шимпанзе, и взаимодействия с рекомбинантным ВКД PSMA яванского макака и ВКД PSMA человека изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием системы ProteOn XPR36 (BioRad), как описано ранее для рекомбинантного ВКД PSMA шимпанзе. Сводные данные по кинетике и аффинности связывания с ВКД PSMA шимпанзе, яванского макака и человека показаны в табл. 20. Это биспецифическое антитело связывается со всеми мишенями с по существу одинаковой аффинностью.

Таблица 20

Сводные данные по кинетике и аффинности связывания PS3B25 и PS3B27 с рекомбинантными ВКД PSMA

мишень	k_a (1/М*с) 10^5		k_d (1/с) 10^{-03}		K_D (нМ)	
	PS3B25	PS3B27	PS3B25	PS3B27	PS3B25	PS3B27
Шимпанзе	2,81±0,08	2,08±0,38	0,99±0,04	1,56±0,37	3,54±0,25	7,48±0,97
Яванский макак	0,98±0,04	1,59±0,12	7,97±0,34	1,10±0,04	81,1±3,3	7,00±0,68
Человек	1,88±0,13	2,87±0,36	1,01±0,05	2,89±0,70	5,38±0,55	10,3±3,2

Оценка биспецифического антитела PS3B27 в каспазном анализе.

Опосредованное Т-клетками уничтожение PS3B27 измеряли с применением второго анализа клеточной токсичности. Анализ цитотоксичности каспазы косвенно измеряет гибель клеток через расщепление флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки.

Замороженные пан CD3+ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие PSMA, (LNCaP, C42) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавок (приобретены у компании Life Technologies).

Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для отбора и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспаза NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела PS3B27 (CD3xPSMA), CD3B288 (CD3xNull) или PS3B46 (PSMAxNull) получали в 2X конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 минут инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны определения обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые шесть часов, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(ах), содержащей(их) самую высокую концентрацию тестируемого(ых) соединения(ий).

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием определения соответствующей обработки. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в зависимости от Log₁₀ нМ соединения. EC₅₀ для каждой кривой дозы, в наномолях (нМ), регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (аппроксимация параметров 4, наименьшие обычные квадраты). Каждый анализ содержал минимум три биологических повтора, и каждую клеточную линию тестировали с использованием пяти здоровых доноров. Данные дополнительно анализировали с помощью доклинической статистики с использованием нелинейной регрессионной модели. Примеры графиков показаны на фиг. 19. Результаты расчетов показаны в табл. 21.

Таблица 21

Сводные данные по значениям EC₅₀ для анализа зависимой от Т-клеток цитотоксичности

Донор	LNCaP FGc	C-42B
M2550	0,27 нМ	0,11 нМ
M5524	0,09 нМ	0,06 нМ
M5772	0,04 нМ	0,03 нМ
M7259	0,05 нМ	0,06 нМ
M7444	0,09 нМ	0,05 нМ

Пример 10. Т-клеточная активация посредством PS3B27 в PSMA-положительных клеточных линиях.

Очищенные пан CD3+ Т-клетки получали от нормальных здоровых доноров корпорацией Biological Specialty Corporation путем отрицательной селекции лейкоферезированных белых кровяных телец и хранили в замороженном состоянии при -80°C или в жидком азоте до готовности к применению. Интактные неактивированные Т-клетки объединяли с клетками-мишенями и биспецифическими антителами к CD3 x PSMA или нулевыми контролями (CD3 x нуль или PSMA x нуль) в соотношении эффектор:мишень 3:1. После инкубации в течение 48 часов надосадочную жидкость анализировали на секрецию цитокинов с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Meso Scale Discovery). Экспрессию мар-

кера активации Т-клеток CD25 измеряли методом проточной цитометрии путем окрашивания Т-клеток на CD45, CD8, CD25 и окрашивания в ближнем ИК-диапазоне. Популяции CD8+/CD25+ были определены путем первоначального гейтирования большой популяции клеток (FSC-A в сравнении с SSC-A), чтобы исключить остатки клеток и агрегаты клеток. Суммирующую подгруппу клеток дополнительно сужали для клеток, которые считали живыми, исключая окрашивание для живых/мертвых клеток. Затем живые клетки гейтировали по CD45+/CD8+ клеткам. Наконец, было выявлено CD8+/CD25+ - положительное подмножество. EC₅₀ для PS3B27 или контроля получали путем построения графика зависимости процентной доли CD8+/CD25+ от биспецифического антитела или контроля Log₁₀ нМ с последующей нелинейной регрессией (аппроксимация параметров 4, метод наименьших квадратов) (фиг. 20). Весь анализ данных проводили в GraphPad Prism.

Пример 11. Противоопухолевая эффективность при профилактике онкогенеза в ксенотрансплантах HEK293-PSMA у PBMC-гуманизированных мышей NSG.

Все эксперименты *in vivo* были выполнены в соответствии с руководством по уходу и применению лабораторных животных и утверждены Институциональным комитетом по уходу и применению животных компании Janssen R & D, г. Спринг-Хаус, штат Пенсильвания, США.

Эффективности PS3B27 (биспецифического антитела PSMA x CD3) оценивали по профилактике онкогенеза (профилактическая модель) в человеческих ксенотрансплантах HEK293-PSMA с использованием инокулированных человеческих донорских мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) у самцов мышей NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ или NOD SCID Gamma, Jackson Laboratories, г. Бар-Харбор, штат Мэн, США). Мышам вводили внутривенно (в/в) в боковую хвостовую вену 1×10^7 человеческих PBMC за 7 дней до имплантации опухолевых клеток. Затем мышам имплантировали подкожно (п/к) клетки HEK293-PSMA в количестве 1×10^7 в заднюю часть правой подвздошной области. Начиная с дня имплантации опухоли, контрольный PBS (фосфатно-солевой буфер), PS3B27, CD3B288 (CD3 x нуль) или PS3B46 (PSMA x нуль) вводили в/в в дозе 0,4 мг/кг один раз в 2 - один раз в 3 дня, всего 5 доз в дни 0, 3, 5, 7 и 10.

Объем опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм³) = (a x b / 2); где "a" представляет собой длину, а "b" ширину опухоли при определении с помощью измерительного инструмента, и отслеживали два раза в неделю в течение всего исследования. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) определяли как разницу между средними объемами опухоли в группе лечения и контрольной группе, рассчитывали как $TGI = [(TVc - TVt) / TVc] * 100$, где TVc представляет собой средний объем опухоли в данной контрольной группе, а TVt представляет собой средний объем опухоли в группе лечения. Как определено критериями NCI, TGI > 60% расценивается как биологически значимое (Johnson, et al (2001) Br J Cancer 84(10): 1424-31). Животных исключали из исследований при достижении максимального объема опухоли 1500 мм³.

Приживление человеческих PBMC в конечном счете вызывало у мышей реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), при которой имплантированные донорские Т-клетки активировались и проникали в ткани организма-хозяина, приводя к потере массы тела, органной недостаточности и неизбежной гибели. Для отслеживания начала и тяжести РТПХ массу тела регистрировали дважды в неделю и выражали в граммах (г). Процентное изменение массы тела вычисляли по формуле: Изменение массы тела = $[(V_t/V_0) * 100]$, где V_t представляет собой массу тела в данный день исследования, а V₀ представляет собой массу тела в начале лечения. Животных с постоянной потерей массы тела более 20% от исходной массы тела считали умирающими и исключали из исследования.

Статистическую значимость определяли с помощью 1-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с множественными сравнениями с использованием критерия множественного сравнения Даннетта с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism (версия 6). Лечение PS3B27 эффективно замедляло онкогенез HEK293-PSMA и рост опухоли (фиг. 21). Небольшие, но пальпируемые опухоли HEK293-PSMA обнаружили у семи из восьми мышей в группе введения PBS в день 16 исследования (через 6 дней после последнего терапевтического лечения), при этом только у одной мыши из восьми в группы лечения PS3B27 была опухоль. У пяти из восьми мышей наблюдались пальпируемые опухоли в группе лечения CD3B288, и у двух из восьми мышей были небольшие опухоли в группе PS3B46. Ингибирование роста опухоли оценивали через 27 дня после прекращения лечения (день 37 после имплантации опухоли), когда в каждой группе было как минимум 7 животных. Рост опухоли в группе лечения биспецифическим антителом PSMA x CD3 (PS3B27) был ингибирован на 90% по сравнению с контрольными животными, которым вводили PBS (n=8 на группу, p < 0,001). Биспецифическое антитело PSMA x нуль (PS3B46) также ингибировало онкогенез и рост статистически значимым образом (TGI= 42%, N=7) в сравнении с контролем PBS (p < 0,05), хотя его не считали биологически значимым эффектом, основываясь на критериях NCI [1].

У группы животных, получающих PBMC, в конечном счете развивалась прогрессирующая реакция РТПХ, однако в настоящем исследовании потеря массы тела была небольшой. Значительную разницу между средними массами тела животных, получавших 0,4 мг/кг PS3B27 по сравнению с PBS, как показано на фиг. 22 до дня 37 после имплантации опухоли (p>0,05). Следовательно, PS3B27-опосредованное

перенаправление Т-клеток дополнительно не вносило вклада в связанную с РТПХ потерю массы тела.

Несмотря на незначительную потерю массы тела в настоящем исследовании, были отмечены смертельные случаи, связанные со спорадическим РТПХ. Одну мышь из группы биспецифического антитела к PSMA x нуль PS3B46 подвергали эвтаназии из-за избыточной (>20%) потери массы тела на день 30 после имплантации опухоли. К 42 дню после имплантации опухоли в PBS (n=1) фиксировали дополнительные смертельные случаи, связанные с РТПХ, группы биспецифического антитела PS3B46 к PSMA x нуль (n=2), и из исследования удаляли несколько дополнительных мышей из-за достижения конечной точки объема опухоли 1500 мм³, и в этот момент все исследование прекращали.

Пример 12. Эффективность PS3B27 в предотвращении онкогенеза в смеси ксенотрансплантатов клеток НЕК293-PSMA/Т-клеток у самцов бестимусных мышей CD1.

Эффективность PS3B27 оценивали в модели ксенотрансплантации, в которой человеческие пан Т-клетки CD3+ и опухолевые клетки совместно вводили самцам бестимусных мышей CD1 (NU-Foxn1nu, Charles River Laboratories, г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США).

Человеческое биспецифическое антитело к PSMA x CD3 PS3B27 или контрольные биспецифические антитела вводили внутривенно каждые 2-3 дня (один раз в 2 дня или один раз в 3 дня), всего 5 доз, как указано. На протяжении всех исследований мышью контролировали (масса тела и измерение опухоли штангенциркулем) два раза в неделю. Дозы лекарственного средства, выраженные в мкг/животное, переводили в мг/кг на основании массы тела 25 г (пример: 10 мкг/животное=0,4 мг/кг). Дозы лекарственного средства, вводимые в мг/кг, вводили 10 мл/кг в зависимости от массы тела (пример: мышь 25 г=0,25 мл).

Объем опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли (мм³) = (a x b²/2); где "a" представляет собой длину, а "b" ширину опухоли при определении с помощью измерительного инструмента, и отслеживали каждую неделю в течение всего исследования. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) определяли как разницу между средними объемами опухоли в группе лечения и контрольной группе, рассчитывали как $TGI = [(TVc - TVt) / TVc] * 100$, где TVc представляет собой средний объем опухоли в данной контрольной группе, а TVt представляет собой средний объем опухоли в группе лечения. В соответствии с критериями NCI TGI ≥ 60% считается биологически значимым [1]. Животных исключали из исследований при достижении максимального объема опухоли 1500 мм³.

Переносимость PS3B27 невозможно оценить в отношении связывания CD3 в тканях организма хозяева из-за отсутствия перекрестной реактивности плеча CD3 к соответствующим мышинным антигенам. Однако Т-клетка, в которую введены опухолевые клетки, экспрессирует человеческий CD3 и может связываться с контролями PS3B27 и CD3X x нуль. Процентное изменение массы тела вычисляли по формуле: Изменение массы тела = $[(Bt - B0)/B0] * 100$, где Bt представляет собой массу тела в данный день исследования, а B0 представляет собой массу тела в начале лечения.

Статистическую значимость определяли с помощью 1-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с множественными сравнениями с использованием критерия множественного сравнения Даннетта с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism (версия 6).

Эффективность PS3B27 оценивали по предотвращению онкогенеза в смесях ксенотрансплантатов, содержащих клетки НЕК293-PSMA и активированные и выращенные CD3-положительные пан Т-клетки в соотношении эффектор - мишень 1:5 у самцов бестимусных мышей CD1 (справочный ELN: CD3-PSMA-2013-00003). Т-клетки активировали и размножали *in vitro* с использованием набора для активации/размножения Т-клеток в среде, содержащей IL-2 (Miltenyi Biotech, г. Оберн, штат Калифорния, США, кат. № 130-091-441, 130-097-743), в течение 12 дней. Мышам п/к имплантировали смесь клеток НЕК293-PSMA в количестве 5×10⁶ и активировали 1×10⁶ и размножали Т-клетки на мышь в 50% Cultrex (Trevigen, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд, США, кат. № 3433-005-01) и 50% бессывороточной среде RPMI 1640 в заднюю правую часть бока. Начиная с того же дня, что и при имплантации опухоли, вводили PBS, PS3B27 в дозе 0,005-0,5 мг/кг, CD3B288 (биспецифическое антитело к CD3 x нуль) в дозе 0,5 мг/кг или PS3B46 (биспецифическое антитело к PSMA x нуль) в дозе 0,5 мг/кг в/в, по массе тела один раз в 2 - один раз в 3 дня, всего 5 доз в дни 0, 2, 4, 7 и 9. (n=10 на группу). Лечение PS3B27 также оценивали путем и/п введения (данные не показаны). Одно животное удаляли на каждые 46 и 49 сутки в контрольной группе PBS для избыточной опухолевой нагрузки. Строили график данных по объему опухолей до дня 64, после чего половину контрольных животных удаляли из исследования из-за избыточного объема опухоли.

Как показано на фиг. 23, онкогенез и рост оценивали в течение 55 дней после прекращения лечения (до дня 64). Лечение PS3B27 значительно ингибировало онкогенез и замедляло рост по сравнению с контролем PBS во всех дозах (0,005, 0,05 или 0,5 мг/кг), что приводило к TGI 73%, 81% и 82% соответственно (p<0,001, p<0,0001, p<0,001 соответственно) на день 64. Лечение PS3B27 путем и/п введения показало такую же эффективность, как и в/в введения (данные не показаны). Животные, получавшие в качестве лечения CD3B288 (биспецифическое антитело к CD3 x нуль) или PS3B46 (биспецифическое антитело к PSMA x нуль), демонстрировали некоторую противоопухолевую активность с TGI 51% и 38% соответственно на день 64 (p<0,05, p=не значимо соответственно), однако это не считается биологически значимым на основании критериев NCI 60% TGI, что демонстрирует требование к связыванию биспецифиче-

ского антитела как с CD3, так и с PSMA для достижения эффективности.

В ходе исследования не наблюдалось потери массы тела, однако у животных, получавших PS3B27 в дозе 0,5 и 0,005 мг/кг, наблюдалось значительно меньшее увеличение массы тела по сравнению с PBS ($p < 0,001$, $p < 0,0001$, соответственно, фиг. 24), однако это может быть связано с меньшей опухолевой нагрузкой у этих животных.

Пример 13. Кристаллическая структура ВКД PSMA человека, связанного с Fab-плечом к PSMA из биспецифического антитела PS3B27.

PSMA представляет собой гомодимерный белок, экспрессируемый на клеточной поверхности. PSMA представляет собой интегральный гликопротеин типа II из 750 остатков на мономер, состоящий из большого домена ВКД (705 остатков) с пептидазной активностью, однопроходного ТМ домена и короткого внутриклеточного домена из 19 остатков. Кристаллическая структура внеклеточной области (ВКД) человеческого PSMA, связанного с Fab-плечом к PSMA из биспецифического антитела PS3B27, была определена с разрешением 3,15 Å, чтобы лучше охарактеризовать сайт объединения между PSMA и антителом.

Внеклеточную область человеческого PSMA (остатки 44-750) экспрессировали в клетках насекомых High Five с N-концевым сигнальным пептидом gp67 с последующей расщепляемой гексагистидиновой меткой (SEQ ID NO: 158).

Секретируемый белок очищали из супернатанта с помощью трехэтапной процедуры, включающей начальный Ni^{2+} -NTA аффинный захват, TEV-опосредованное расщепление гистидиновой метки с последующей стадией обратной аффинной хроматографии и заключительной стадией эксклюзионной хроматографии. Очищенный PSMA-ВКД замораживали в жидком азоте и хранили при $-80^{\circ}C$ в 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 0,1 mM $ZnCl_2$.

Fab PSMB83, который является исходным Fab-плечом против PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, экспрессировался в клетках HEK293 Exp1 с гексагистидиновой меткой (SEQ ID NO: 158) и очищали с помощью аффинной (HisTrap, GE Healthcare) и гель-фильтрационной хроматографии (SEC-300, Phenomenex Yarra). Fab хранили при $4^{\circ}C$ в 50 mM NaCl, 20 mM Трис, pH 7,4.

Комплекс ВКД PSMA человека/Fab PSMB83 получали с помощью трехстадийной процедуры. Сначала Fab заменяли на 20 mM MES, pH 6,0, 150 mM NaCl. Затем Fab и PSMA смешивали (1,5 молярный избыток Fab по отношению к мономеру PSMA) и инкубировали в течение ночи при $4^{\circ}C$ при диализе в 20 mM MES, pH 6,0. Наконец, комплекс связывали с колонкой monoS 5/50 в 20 mM MES, pH 6,0, и элюировали градиентом NaCl.

Кристаллы, подходящие для рентгеноструктурного анализа, были получены с использованием метода диффузии паров в сидячей капле при $20^{\circ}C$ и робота Mosquito LCP (TTP Labtech). Кристаллы Fab PSMB83, связанного с ВКД PSMA человека, выращивали из 18% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 M Трис, pH 8,5 с микрозатравками и комплексом PSMA/Fab первоначально в концентрации 7,3 мг/мл. Кристаллы несвязанного PSMB83 Fab получали из 25% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M LiCl, 0,1 M ацетата pH 4,5, при этом Fab первоначально содержалось в концентрации 8,8 мг/мл.

Структуры были расшифрованы путем молекулярного замещения (MR) с помощью Phaser (программное обеспечение Phaser Crystallographic Software, Кембриджский университет). Поисковой моделью MR для структуры Fab PSMB83 был код PDB 4M6O. Структуру комплекса PSMA/Fab определяли с использованием кристаллических структур PSMA (код PDB: 2C6G) и PSMB83 Fab (структура с разрешением 1,93 Å; данные не показаны) в качестве поисковых моделей MR. Структуры были уточнены с помощью PHENIX (Adams, et al, 2004), а корректировки модели были выполнены с помощью COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Все остальные кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета программ CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Все молекулярные графики были созданы с помощью PyMol (система молекулярной графики PyMOL, версия 1.4.1, Schrodinger, LLC), а определяющие комплементарность области (CDR) были определены с использованием определения по Kabat.

Структура PSMA/Fab включает остатки 1-211 легкой цепи Fab, остатки 1-224 тяжелой цепи Fab (за исключением остатков 138-146, которые неупорядочены) и остатки 56-750 PSMA, что соответствует протеазе (остатки 56-116 и 352-590), апикальный (остатки 117-351) и спиральный (остатки 591-750) домены и семь из десяти возможных N-связанных гликанов (в Asn-76, -121, -140, -195, -459, -476 и -638) на субъединицу димера PSMA. Активный участок PSMA яванского макака размещен на поверхности раздела между тремя доменами, и он содержит два атома цинка, скоординированных гистидином (H377 и H553) и остатками глутамата/аспартата (D387, каталитический E424, E425 и D453), и молекулу воды. Кристаллическое асимметричное звено содержит один димер PSMA, причем каждая субъединица связана аналогично Fab PSMB83. Сайт связывания Fab/PSMA хорошо определяется картой электронной плотности, что позволяет надежно позиционировать связывающие остатки. Молекулы Fab и PSMA последовательно пронумерованы на фиг. 25-30.

Эпитоп, паратоп и взаимодействия PSMB83. PSMB83, который является исходным Fab-плечом к PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, распознает конформационный и прерывистый эпитоп в апикальном домене PSMA (фиг. 25). Площадь поверхности PSMA, погруженная Fab, составляет около 700 \AA^2 . В частности, остатки эпитопа PSMB83 представляют собой I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326. Спираль $\alpha 7$ (остатки Y299-E307) является преобладающей обла-

стью эпитопа и связывается через CDR тяжелой и легкой цепей Fab. На одном конце спирали Y299 и Y300 образуют ароматический кластер с остатками Fab Y57^H, W94^L и остатками PSMA F235 и P237, тогда как E307 на другом конце спирали образует соляной мостик с R91^L и водородными связями Y32^L. На фиг. 26 и 27 показаны основные взаимодействия PSMA с легкой и тяжелой цепями PSMB83. Остатки эпитопа PSMB83 являются консервативными для человека и яванского макака (фиг. 28), и было продемонстрировано, что биспецифическое антитело PS3B27 связывается со сходной аффинностью с PSMA человека и яванского макака. Напротив, ожидается, что мутации эпитопа G238A и особенно Y300D от человека к мыши будут снижать аффинность связывания PSMB83 с мышинным PSMA по сравнению с человеческим. Мутация Y300D нарушает контакт водородной связи с N59^H и стыковочное взаимодействие с W94^L. Паратоп PSMB83 состоит из остатков всех CDR, за исключением CDR-L2 и CDR-H1 (фиг. 29). В частности, остатки паратопа представляют собой S30^L, Y32^L, R91^L, S92^L, W94^L легкой цепи и G56^H-N59^H, K65^H, G66^H, Y101^H, V107^H и D109^H тяжелой цепи. На фиг. 30 показаны контакты взаимодействия между PSMA и PSMB83. Удаленное расположение эпитопа способствует связыванию Fab-плеча к PSMB83 в биспецифическом антителе к PS3B27 с мембраносвязанным PSMA, а другое Fab-плечо по-прежнему связано с CD3 в Т-клеточной мембране. Предполагается, что PSMB83 не будет ингибировать ферментативную активность PSMA, поскольку антитело связывается с активным центром и не вызывает каких-либо значительных структурных изменений в PSMA, которые могут повлиять на ферментативную функцию, например, движения петли, которые закрывают активный центр, или смещение каталитических остатков (RMSD 0,3 Å для суперпозиции Ca молекул PSMA в связанных и несвязанных Fab (Barinka et al, 2007) структурах).

Пример 14. Созревание аффинности антитела к PSMA.

Созревание аффинности проводили на фаговых клонах Fab к PSMA из двух библиотек созревания аффинности PSMA для идентификации антитела с повышенной аффинностью связывания по сравнению с исходным PSMB127 (ID fab=PSMB83). Были созданы две библиотеки для созревания аффинности PSMB127. В первой библиотеке CDR1 и CDR2 тяжелой цепи рандомизировали в соответствии с дизайном, приведенным в табл. 22 (PH9H9L1). Фрагмент Н-CDR3 амплифицировали с помощью ПЦР из pDR000024032 и расщепляли SacII+XhoI. Этот фрагмент клонировали в библиотеку PH9H9L1/PH9L3. Его трансформировали в клетки E.coli MC1061F' и получали фаг, отображающий эту библиотеку Fab. Во второй библиотеке CDR легкой цепи были рандомизированы в соответствии с дизайном в табл. 25 (PH9L3L3). Тяжелую цепь из PSMB83 (PSMH360) амплифицировали с помощью ПЦР и расщепляли NcoI+XhoI. Этот фрагмент был клонирован в ДНК библиотеки PH9L3L3 (ELN: фаговая библиотека De Novo 2010 SRI-021). Им трансформировали клетки E.coli MC1061F', и получали фаг, отображающий эту библиотеку Fab.

Таблица 22

Дизайн библиотеки PH9H9L1

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Y	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	A	A, E, L, N, R, T, W, Y
52	S	A, D, L, N, R, S
54	S	A, E, N, S, Y
57	S	D, N, R, S, T, Y
59	Y	E, G, N, Q, R, Y

Дизайн библиотеки PH9L3L3

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Y	D, N, R, S, Y
49	Y	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	S	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

Пэннинг в растворе для Fab-pIX-библиотек созревания аффинности к PSMA выполняли по отношению к биотинилированному ВКД PSMA человека в течение трех раундов. Связанный с фагом антиген захватывали нейтравидиновыми гранулами (GE Health Care Life Science, кат. № 78152104011150) в соответствии с протоколом производителя с последующими интенсивными промывками 1x PBST (0,05% Твин-20) и длительной инкубацией с немеченым ВКД PSMA в 500-кратном молярном избытке биотинилированного антигена. В результате пэннинга получили клоны, PSMXP46R3_59H09, PSMXP46R3_59H06, PSMXP46R3_59E03, PSMXP46R3_59C09, PSMXP46R3_59H01, PSMXP46R3_59F11, и PSMXP46R3_59F07.

Для определения уровня экспрессии клонов fab к PSMA 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали в течение ночи при 4°C антитело к Fd IgG человека, промывали и блокировали 3% молоком-PBS-0,05% Твин в течение 1 ч. Образцы супернатанта фага были серийно разбавляли в 2 раза для 11 разведений в блокирующем буфере с последней лункой для контроля. 100 мкл этих растворов захватывали на покрытых планшетах в течение 1 ч. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab')₂ в течение 1 ч. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (фиг. 31).

Для определения связывания клонов Fab к PSMA с рекомбинантным белком человека и яванского макака 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали 100 мкл 5 мкг/мл нейтравидина в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали и блокировали 3% водным раствором PBS-0,05% Твина в течение 1 час. Рекомбинантные биотинилированные белки PSMA человека и яванского макака захватывали в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и 100 мкл 2-кратно серийно разведенного супернатанта Fab собирали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, а затем инкубировали в течение 2,5 ч с 200 мкл 0,3% молока в PBST, чтобы смыть некоторые из Fab со слабой аффинностью. Затем проводили еще 30 минут инкубации со свежеприготовленными 200 мкл 0,3% молока в PBST в для удаления Fab с более слабой аффинностью. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab')₂ в течение 1 ч. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (фиг. 32 и фиг. 33). На фиг. 31 показано, что белковая экспрессия исходного Fab и Fab с созревшей аффинностью была сходной. Значения оси Y представляют люминесценцию реагента обнаружения, которая соответствует содержанию белка fab на кривой разведения; чем выше показатель люминесценции, тем больше белка в лунке, которое уменьшается при последовательных двукратных разведениях. В лунках с fab со зрелой аффинностью было больше белка, но увеличение по сравнению с исходным было не более чем в пять раз больше, что демонстрируется значениями EC₅₀ (которые представляют собой концентрацию белка, которая дает половину максимального ответа). Эти данные демонстрируют, что различие в профилях связывания с PSMA на фиг. 32 и фиг. 33 не связано с различием в концентрации Fab.

На фиг. 32 показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с человеческим рекомбинантным антигеном по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA человека. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинно-

стью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было равно нулю, невозможно было получить EC_{50} .

На фиг. 33 показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с рекомбинантным антигеном яванского макака по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA яванского макака. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинностью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было нулевым, для прямого сравнения нельзя было получить EC_{50} .

В целом профили связывания Fab фагов демонстрируют улучшенное связывание с рекомбинантным антигеном человека и яванского макака по сравнению с исходным мкАт к PSMA (PSMB127). Это улучшение не является результатом различий в профилях экспрессии Fab, как показано на фиг. 34 и фиг. 35, демонстрирующих связывание Fab с созревшей аффинностью, нормализованное к уровням экспрессии Fab. Пять лучших Fab-кандидатов, идентифицированных с помощью скрининга на основе ИФА, были получены в формате моноклональных антител IgG4 PAA. В табл. 24 перечислены последующие идентификаторы мкАт, а в табл. 25 и 26 представлена информация о последовательности.

Таблица 24

Пять основных антител со зрелой аффинностью,
идентифицированных с помощью ИФА

ID ячейки	HC	LC	ID белка мкАт
	SEQ ID	SEQ ID	
PSMXP46R3_59C09	PSMH859	PSML160	PSMB346
PSMXP46R3_59E03	PSMH859	PSML159	PSMB345
PSMXP46R3_59F07	PSMH862	PSML158	PSMB349
PSMXP46R3_59H01	PSMH860	PH9L3	PSMB347
PSMXP46R3_59H06	PSMH859	PH9L3	PSMB344

Последовательности VH и VL для пяти лучших Fab-кандидатов к PSMA

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB3 44	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLTVSS	138	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	67
PSMB3 45	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLTVSS	138	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	142
PSMB3 46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF	138	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT	143

	DYWGQGTLVTVSS		ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB3 47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRAATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	67
PSMB3 49	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRAATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIK	144

Таблица 26

Последовательности тяжелой и легкой цепей пяти лучших кандидатов к PSMA в формате моноклонального антитела IgG4 PAA

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGSGG YTNYADSMKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTKTY	145	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGT DFLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYE	89

	<p>TCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK</p>		<p>KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	
<p>PSMB345</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGSGG YTNYADSMKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVVTPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP</p>	<p>145</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLA WYQQKPGQAPRLLIHD ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAV YYCQRRNWPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC</p>	<p>148</p>

	ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK			
PSMB346	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGSGG YTNYADSMKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDF DYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRV SKYGPPCPPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK	145	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS YRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFAVYY CQQRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	149
PSMB347	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGSGG YTNYADSMKSRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDF	146	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFAVYY CQQRSNWPLTFGQGTK	89

	<p>DYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK</p>		<p>VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	
<p>PSMB349</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFKSDAMHWV RQAPGKGLEWVSEISGGG YTNYADSLKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE</p>	<p>147</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSELEPEDFAVYY CQQRGNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	<p>150</p>

EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK			
--	--	--	--

3 различных HC и 4 различных LC были объединены в матричный формат для увеличения разнообразия отобранных вариантов (табл. 26). Учитывая, что метионин в CDR2 PSMH860 имеет риск посттрансляционной модификации, была создана новая последовательность с M64L и обозначена как PSMH865. PSMH865 соединяли с PSML160 для создания мкАт PSMB365. В табл. 27 и 28 представлена информация о последовательности.

Таблица 26

Матричный формат комбинированных 3 тяжелых цепей и 4 легких цепей			
	PSMH859	PSMH860	PSMH862
PH9L3	PSMB344	PSMB347	PSMB358
PSML158	-	PSMB361	PSMB349
PSML159	PSMB345	PSMB362	PSMB359
PSML160	PSMB346	PSMB363	PSMB360

Таблица 27

Последовательности VH и VL отобранных соединений к PSMA
из рекомбинированной матрицы

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB3 58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGGGYTNYADSLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRRATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	67
PSMB3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA	140	EIVLTQSPATLSLSPG	142

59	ASGFTFKSDAMHWRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSS		ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB3 60	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	143
PSMB3 61	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIK	144
PSMB3 62	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	142
PSMB3 63	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE	139	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP	143

	DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS		ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB3 65	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSDYSSLYVGDYFD YWGQGTLVTVSS	141	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	143

Таблица 28

Последовательности тяжелой и легкой цепей отобранных соединений к PSMA
из рекомбинированной матрицы

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB3 58	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNV D HKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLD	147	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEEKHV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	89

	DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK			
PSMB3 59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	147	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	148
PSMB3 60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF	147	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES	149

	PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK		VTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
PSMB3 61	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	146	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	150
PSMB3 62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE	146	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHNASNRATGIP	148

	<p>DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>		<p>ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREKQVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC</p>	
<p>PSMB3 63</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY</p>	146	<p>EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREKQVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC</p>	149

	DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK			
PSMB3 65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSDYDSSLYVGDYFD YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGD SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	151	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSTLSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	149

В табл. 29 представлены CDR для всех совпадений с созревшей аффинностью.

Таблица 29

Последовательности CDR отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью

ID мкАт		CDR (SEQ ID NO:)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB3 44	H	SDAMH	EISGSGGYTNYADS	DSYDSSLYVGDYFDY
	C	(25)	MKG (130)	(27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRSNWPLT (30)
PSMB3 45	H	SDAMH	EISGSGGYTNYADS	DSYDSSLYVGDYFDY
	C	(25)	MKG (130)	(27)

	L C	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 46	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS MKG (130)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 47	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS MKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (30)
PSMB3 49	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS LKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (136)
PSMB3 58	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS LKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (30)
PSMB3 59	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS LKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 60	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS LKG (135)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 61	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS MKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (136)
PSMB3 62	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS MKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)

	L C	RASQSVSNYLA (131)	DASNRAT (29)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 63	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS MKS (134)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)
PSMB3 65	H C	SDAMH (25)	EISGSGGYTNYADS LKS (137)	DSYDSSLYVGDYFDY (27)
	L C	RASQSVSSYLA (28)	DASYRAT (133)	QQRNWPLT (132)

Пример 15. Создание биспецифических антител с созревшей аффинностью к PSMA x CD3.

Были получены два типа биспецифических антител к PSMA x CD3 с созревшей аффинностью: одно, специфическое для нацеливающего плеча (например, антитело к PSMA с созревшей аффинностью), рекомбинированного с высокоаффинным плечом к CD3 [CD3B219 (VH SEQ ID NO: 104, VL SEQ ID NO: 105; HC с SEQ ID NO: 110, LC SEQ ID NO: 111)] или низкоаффинным плечом к CD3, называемым CD3B376 [CD3B376 (VH SEQ ID NO: 152, VL SEQ ID NO: 153; HC с SEQ ID NO: 154, LC SEQ ID NO: 155)].

Таблица 30

Последовательности для низкоаффинного плеча к CD3 (CD3B376)

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
CD3B376	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSL TCAISGDSVFNNNAAWSWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSK WLYDYAVSVKSRITVNPDT SRNQFTLQLNSVTPEDTALY YCARGYSSSFQYWGQGLV TVSS	152	QSALTQPASVSGSPGQSI TISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLEYE VSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQAD YHCVSYAGSGTLLFGGG TKLTVL	153
	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи		Аминокислотная последовательность легкой цепи	
	MAWVWTLLFLMAAAQSIQ AQVQLQQSGPRLVRPSQTLS LTCAISGDSVFNNNAAWSW	154	MARSALLILALLLGLFS PGAWGQSALTQPASVS GSPGQSITISCTGTSSNIG	155

IRQSPSRGLEWLGRTYYRSK	TYKFVSWYQQHPDKAP
WLYDYAVSVKSRITVNPDT	KVLLYEVS KRPSGVSSR
SRNQFTLQLNSVTPEDTALY	FSGSKSGNTASLTISGLQ
YCARGYSSSFQDYWGQGLV	AEDQADYHCVSYAGSG
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS	TLLFGGGTKLTVLQPK
TSESTAALGCLVKDYFPEPV	AAPSVTLFPPSSEELQAN
TVSWNSGALTSGVHTFPAV	KATLVCLISDFYPGAVT
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG	VAWKADSSPVKAGVET
TKTYTCNVDPKPSNTKVDK	TTPSKQSNKYAASSYL
RVESKYGPPCPPCPAPEAAG	SLTPEQWKS HRSYSCQV
GPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP	THEGSTVEKTVAPTECS
EVTCVVVDVSDPEVQFN	
WYVDGVEVHNAKTKPREE	
QFNSTYRVVSVLTVLHQDW	
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE	
KTISKAKGQPREPQVYTLPP	
SQEEMTKNQVSLTCLVKGF	
YPSDIAVEWESNGQPENNY	
KTTPPVLDSDGSFLLYSKLT	
VDKSRWQEGNVFSCVMHE	
ALHNHYTQKSLSLGLGK	

Эти исходные мкАт находятся в формате GenMab (Labrijn et al, 2013), в котором нацеливающее исходное мкАт (PSMA) содержит мутацию 409R GenMab (нативную аминокислоту для IgG4), а уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L GenMab и мутацию R409K. Моноспецифическое антитело к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в областях Fc. Нацеливающее исходное мкАт (PSMA) находится в формате человеческого IgG4 с заменами в Fc S228P, F234A, L235A. Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях HEK под контролем промоторов CMV.

Исходные антитела к PSMA и CD3 очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером, содержащим 100 мМ NaAc, pH 3,5, и нейтрализующим буфером 2,5 М Tris, pH 7,2. Нейтрализованные исходные мкАт использовали для получения биспецифических антител к PSMAxCD3. Часть исходных мкАт дополнительно заменяли буфером D-PBS, буфером с pH 7,2 для аналитических измерений и анализов.

После очистки выполняли контролируемый обмен Fab-плечами для получения биспецифических антител, как описано в примере 6.

Полученные конечные биспецифические антитела вместе с исходными мкАт (т.е. PSMA, CD3 или "Null" (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в табл. 27 и 28.

Отобранные подходящие антитела к PSMA также объединяли с неуничтожающим плечом ("Null") для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA и комбинировали или с плечом к CD3 CD3B219-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3 x нуль), либо с плечами к PSMA, PSMB122, PSMB126, PSMB130 для получения PS3B37, PS3B39 и PS3B40, соответственно (PSMA x нуль). Эти мкАт с созревшей PSMA-специфической аффинностью скрещивали (как в способах выше) с CD3B219 и CD3B376 с получением биспецифических антител, показанных в табл. 31.

Таблица 31

Создание биспецифических антител к PSMA x CD3 с созревшей аффинностью, полученных из соединений с созревшей аффинностью PSMB127

Ид. номер	Плечо 1	HC	LC	Плечо 2	HC	LC
		SEQ ID:	SEQ ID:		SEQ ID:	SEQ ID:
PS3B60	PSMB344	145	89	CD3B219	110	111
PS3B61	PSMB345	145	148	CD3B219	110	111
PS3B62	PSMB346	145	149	CD3B219	110	111
PS3B63	PSMB347	146	89	CD3B219	110	111
PS3B64	PSMB349	147	150	CD3B219	110	111
PS3B70	PSMB358	147	89	CD3B219	110	111
PS3B71	PSMB359	147	148	CD3B219	110	111
PS3B72	PSMB360	147	149	CD3B219	110	111
PS3B73	PSMB361	146	150	CD3B219	110	111
PS3B74	PSMB362	146	148	CD3B219	110	111
PS3B75	PSMB363	146	149	CD3B219	110	111
PS3B76	PSMB358	151	149	CD3B376	154	155
PS3B77	PSMB349	145	89	CD3B376	154	155
PS3B78	PSMB359	145	148	CD3B376	154	155
PS3B79	PSMB360	145	149	CD3B376	154	155
PS3B80	PSMB347	146	89	CD3B376	154	155
PS3B81	PSMB361	147	150	CD3B376	154	155
PS3B82	PSMB362	147	89	CD3B376	154	155
PS3B83	PSMB363	147	148	CD3B376	154	155
PS3B84	PSMB344	147	149	CD3B376	154	155
PS3B85	PSMB345	146	150	CD3B376	154	155
PS3B86	PSMB346	146	148	CD3B376	154	155
PS3B90	PSMB365	146	149	CD3B376	154	155

Биспецифические антитела к PSMA×CD3 тестировали на связывание с линией PSMA-положительных клеток, LNCAP, с линией PSMA-отрицательных клеток, PC3. Для оценки возможностей связывания биспецифических антител к PSMA использовали анализ связывания клеток (описанный ранее). Биспецифические антитела нормализовали по концентрации белка, а затем инкубировали с таким же количеством клеток, экспрессирующих PSMA человека или яванского макака. СИФ для каждой концентрации получали с помощью проточной цитометрии и наносили на график в виде функции от концентрации. Данные преобразовывали с помощью log10 и затем наносили на график. Для определения EC₅₀ строили кривые связывания методом нелинейной регрессии.

Эти относительные значения использовали для ранжирования связывания PSMA с целевыми клетками. На фиг. 36-38 показано связывание всех полученных биспецифических антител с LNCAP. На фиг. 38 ни один из конструкций не продемонстрировал связывания с линией PSMA-отрицательных клеток. На фиг. 36 и Фиг. 37 все отобранные соединения с созревшей аффинностью продемонстрировали повышенную аффинность связывания по сдвинутым влево кривым и повышенному сМах по сравнению с исходным мкАт, PS2B27.

Взаимодействие биспецифических антител с созревшей аффинностью с рекомбинантным ВКД PSMA яванского макака и ВКД PSMA человека изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием системы ProteOn XPR36 (BioRad), как описано ранее для рекомбинантного ВКД PSMA шимпанзе. Все биспецифические антитела связываются с обоими мишенями с по существу одинаковой аффинностью, при этом KD находится в диапазоне от 0,05 нМ до 0,27 нМ для ВКД PSMA человека и от 0,05 нМ до 0,23 нМ для ВКД PSMA яванского макака.

Пример 16. Оценка биспецифических антител с созревшей аффинностью к CD3 и PSMA в анализе функционального уничтожения клеток.

На основании приведенных выше данных, измерений аффинности и идентичности последовательностей три антитела к PSMA, PSMB347, PSMB360 и PSMB365 в качестве биспецифических антител с CD3B219 или CD3B376, были дополнительно охарактеризованы на способность опосредовать PSMA-специфическую перенаправленную цитотоксичность Т-клеток. Опосредованное Т-клетками уничтожение измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки. Замороженные пан CD3+ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие PSMA, (LNCaP, C42) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавок (приобретены у компании Life Technologies).

Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для отбора и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспазы NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела PS3B27 (CD3xPSMA), CD3B288 (CD3xNull) или PS3B46 (PSMAxNull) получали в 2X конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 минут инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны определения обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые шесть часов, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(-ах), содержащей (-их) самую высокую концентрацию тестируемого(-ых) соединения(-ий). Как показано на фиг. 39, кривые для PS3B80, PS3B79, PS3B89, PS3B90, PS3B63 и PS3B72 смещаются влево, что указывает на повышенную активность относительно PS3B27. Как и ожидалось, контрольные антитела с нулевым плечом не индуцировали гибель клеток.

Пример 17. Противоопухолевая эффективность в предотвращении опухолеобразования ксенотрансплантатов LnCaP у гуманизированных мышей NSG.

Эффективность PS3B79 и PS3B90 оценивали в развившихся ксенотрансплантатах человеческих клеток рака предстательной железы 3D LnCaP AR.TV у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), гуманизированных внутрибрюшинно (в/б) Т-клетками человека. PS3B79 и PS3B90 в дозах 2,5 и 5 мг/кг или контрольное антитело Null×CD3B376 вводили каждые 3-4 дня на 36, 39, 43, 47, 50, 53, 56, 60 и 63 дни, всего 8 доз. На 53-й день после имплантации опухоли, который был последней датой исследования, когда в группе оставалось девять (9) животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для PS3B79 в дозе 5 мг/кг с 42% TGI (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони, *p<0,0001, фиг. 40) и для PS3B90 в дозе 2,5 и 5 мг/кг с 53% и 33%, соответственно, по сравнению с контролем нуль x CD3 (двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Бонферрони, *p<0,001, фиг. 41). Таким образом, CD3B376 способен индуцировать активацию Т-клеток и цитотоксичность *in vivo* и способен приводить к ингибированию роста опухоли в биспецифическом формате с помощью высокоаффинных PSMA-связывающих плеч, PSMB360 и PSMB365.

Пример 18. Эффективность PSMA x CD3 в установленной модели ксенотрансплантата LuCaP 86.2 предстательной железы у гуманизированных Т-клетками мышей NSG.

Противоопухолевую эффективность PS3B72 оценивали в установленной модели полученной от пациента ксенотрансплантата (PDX) опухоли предстательной железы LuCaP 86.2 у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), гуманизированных внутрибрюшинно (и/п) человеческими пан-Т-клетками. PS3B72 в дозе 0,5 или 5 мг/кг или контрольное антитело нуль x CD3 вводили один раз в три дня или один раз в четыре дня в дни 45, 49, 52, 56, 59, 63, 66, 70, 73 и 77, после имплантации опухоли в общей сложно-

сти 10 доз. На 83-й день после имплантации опухоли, который был последним днем исследования, когда в группе оставалось все десять животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для PSMA x CD3 при дозах как 0,5, так и 5 мг/кг с 108% и 101% A TGI (линейный анализ со смешанными эффектами с использованием корректировки FDR, * $p < 0,0001$, фиг. 42) соответственно в сравнении с контролем нуль x CD3. К концу периода дозирования в течение 5 недель в группе PSMA x CD3 в дозе 0,5 мг/кг наблюдали 9 из 10 полных регрессий (CR). До завершения исследования эти мыши 9 оставались без опухолей. По окончании исследования 4 из 10 CR наблюдали в группе PS3B72 в дозе 5 мг/кг. После введения мышам PS3B72 в дозе 5 мг/кг в отсутствие гуманизации Т-клеток противоопухолевая эффективность не наблюдалась.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно.

2. Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 66 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 67.

3. Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, содержащее VH SEQ ID NO: 66 и VL SEQ ID NO: 67.

4. Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело относится к изотипу IgG4.

5. Выделенное рекомбинантное антитело к PSMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащее замены S228P, F234A и L235A, где нумерация остатков соответствует нумерации EU.

6. Биспецифическое антитело, содержащее первый домен, специфически связывающий PSMA, и второй домен, специфически связывающий CD3, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно.

7. Биспецифическое антитело по п.6, отличающееся тем, что первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30 соответственно, и VH представляет собой SEQ ID NO: 66, и VL представляет собой SEQ ID NO: 67.

8. Биспецифическое антитело по п.7, отличающееся тем, что первый домен содержит VH SEQ ID NO: 66 и VL SEQ ID NO: 67, а второй домен содержит VH SEQ ID NO: 104 и VL SEQ ID NO: 105.

9. Биспецифическое антитело по п.8, содержащее первую тяжелую цепь (HC1), первую легкую цепь (LC1), вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), где HC1 и LC1 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88 и 89 соответственно.

10. Биспецифическое антитело по п.9, отличающееся тем, что HC2 и LC2 содержат SEQ ID NO: 110 и 111 соответственно.

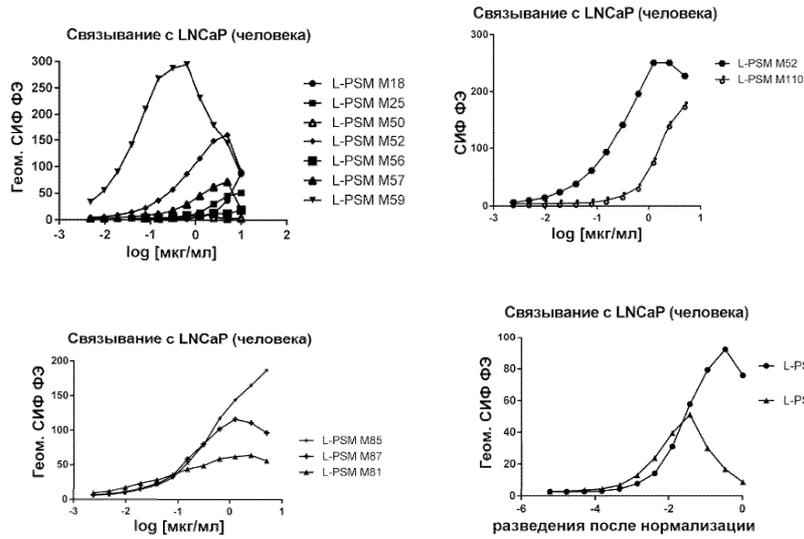
11. Биспецифическое антитело по п.10, содержащее HC1, LC1, HC2 и LC2, выбранные из SEQ ID NO: 88, 89, 110, 111 соответственно.

12. Биспецифическое антитело по любому из пп.6-11, отличающееся тем, что антитело относится к изотипу IgG4.

13. Биспецифическое антитело по п.12, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене CH3 антитела.

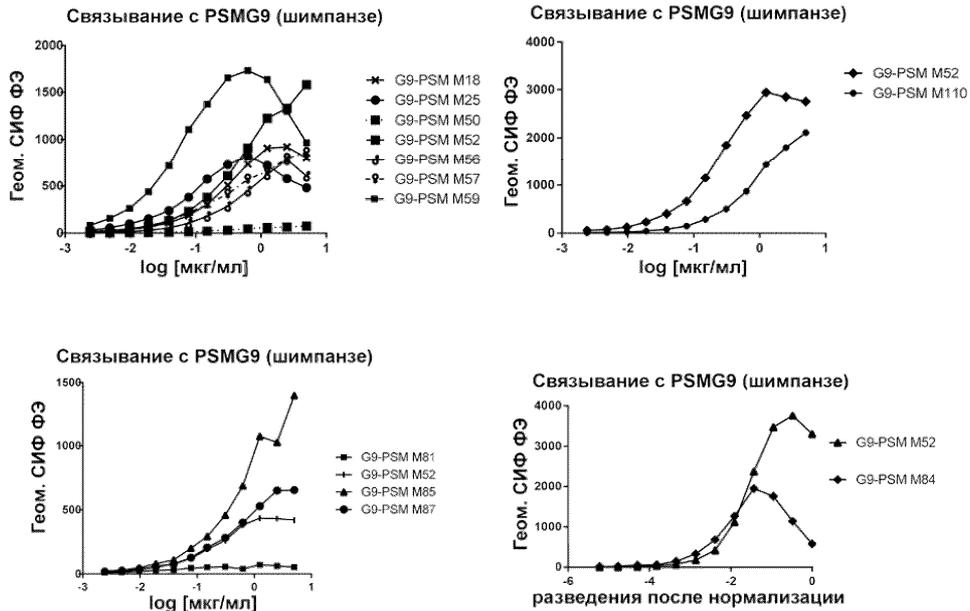
14. Биспецифическое антитело по п.13, отличающееся тем, что замена в константном домене CH3 антитела представляет собой замену 409R, F405L или F405L/R409K, где нумерация остатков соответствует нумерации EU.

Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA по сравнению с LNCaP



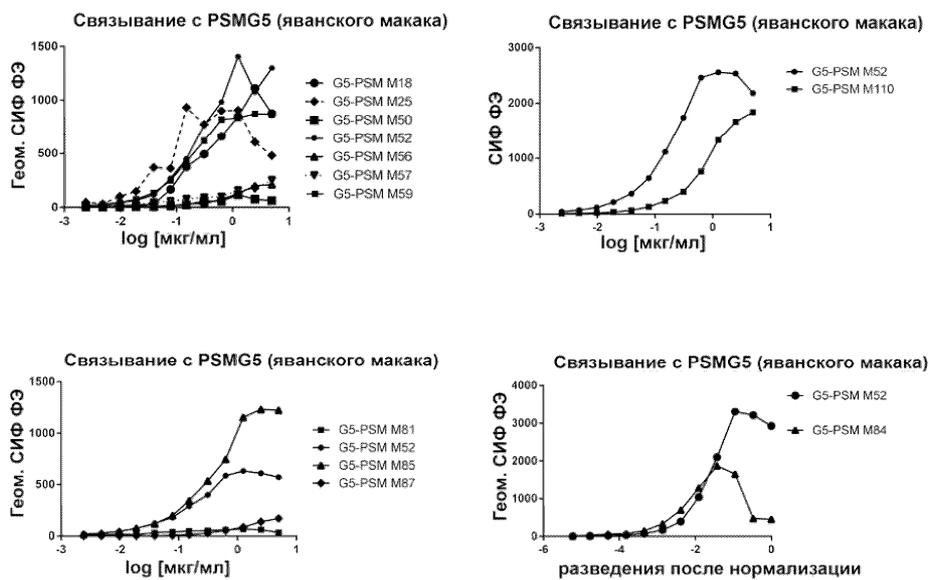
Фиг. 1

Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и HEK, экспрессирующих PSMA шимпанзе



Фиг. 2

Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового э́ннинга соединений к PSMA по сравнению с НЕК, экспрессирующими PSMA яванского макака



Фиг. 3

Легкая цепь (SEQ ID NO: 114)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGV
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTL
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
FPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVTVDWKVDGTFVTQGMETTQPSKQSNNKYMSSY
      190     200     210
      |      |      |
LTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKLSLRADCS

```

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 113)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
EVKLLLESGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
YYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
VTVSAATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVRTVSS
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
VLQSAFYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKRIEPRIPKPSTPPGSSCPPG
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
NILGGPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQPR
      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
EAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYTIP
      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
PPREQMSKKVSLTCLVTNFFSEAISVEWERNGELEQDYKNTPPILDSDGTYFLYSLTV
      430     440
      |      |
DTDSWLQGEIFTCSVVEALHNHHTQKNLSRSPGK

```

16/48

Фиг. 4

VH

	10	20	30	40	50	60
sp34	EVKLL ESGGGLVQ PKGSLKLS CAASGFT FNTYAMNWVRQ APGKGLEWV ARIRSKYNNYATY					
CD3H141	EV Q LV ESGGGLVQ PK G SLRLS CAASGFT FNTYAMNWVRQ APGKGLEWV ARIRSKYNNYATY					
CD3H142	EV Q LV ESGGGLVQ PK G SLRLS CAASGFT FNTYAMNWVRQ APGKGLEWV ARIRSKYNNYATY					
CD3H143	EV Q LV ESGGGLVQ PK G SLRLS CAASGFT FNTYAMNWVRQ APGKGLEWV ARIRSKYNNYATY					
CD3H144	EV Q LV ESGGGLVQ PK G SLKLS CAASGFT FNTYAMNWVRQ ASGKGLEWV GRIRSKYNGYATY					

	70	80	90	100	110	120
sp34	YADSVKDRFTISRDDS Q SILYLQMN N LK T EDTAMYYCVRHGN F GN S YV S WFAYWGQ G TLVTVSA					
CD3H141	YA AS VKGRFTISRDDS K N S LYLQMN S LK T EDTAVYYC A RHGN F GN S YV S WFAYWGQ G TLVTVSS					
CD3H142	YADSVKGRFTISRDN S K N TLYLQMN S LRAEDTAVYYC A KHGN F GN S YV S WFAYWGQ G TLVTVSS					
CD3H143	YADSVKGRFTISRDN S K N TLYLQMN S LRAEDTAVYYC V KHGN F GN S YV S WFAYWGQ G TLVTVSS					
CD3H144	YA AS VKGRFTISRDDS K N T A L YLQMN S LK T EDTAVYYC T RHGN F GN S YV S WFAYWGQ G TLVTVSS					

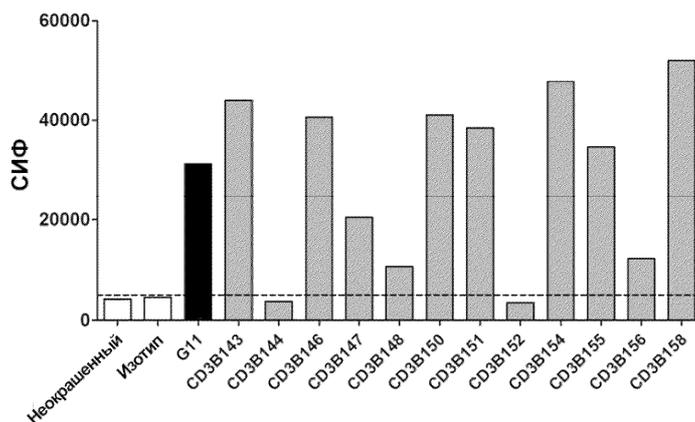
VL

	10	20	30	40	50	60
sp34	QAVVTQES-ALTTSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG T NKRA P GV					
CD3L63	QAVVTQ E P-SLTVSPGGT V ILTCRSSTGAVTTSNYANW V Q K P Q AP R GLIGG T NKRA P GT					
CD3L64	Q S VLT Q PP-S V SAA P Q K V T ISCRSSTGAVTTSNYANW V Q L P G TAP K GLIGG T NKRA P GI					
CD3L66	Q T VVTQ E P-SLTVSPGGT V ILTCRSSTGAVTTSNYANW V Q K P Q AP R GLIGG T NKRA P GT					

	70	80	90	100	110
sp34	PARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL				
CD3L63	PARFSGSL L GGKAAL L LSGAQ P EDEAE Y CALWYSNLWVFGGGTKLTVL...				
CD3L64	PDRFSGS K SGTS A T L GITGLQ T GDEAD Y CALWYSNLWVFGGGTKLTVL...				
CD3L66	PARFSGSL L GGKAAL L LSG V Q P EDEAE Y CALWYSNLWVFGGGTKLTVL...				

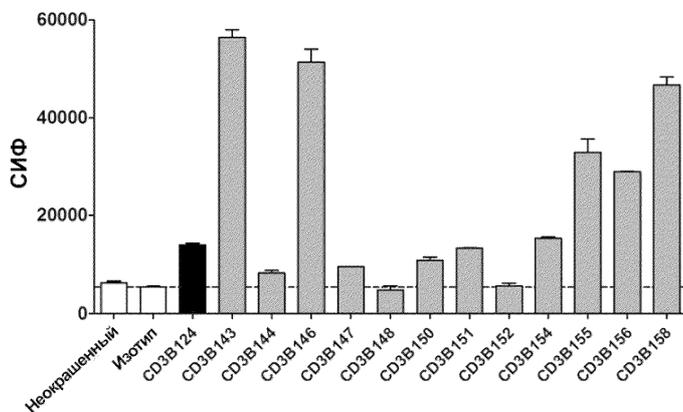
Фиг. 5

Связывание



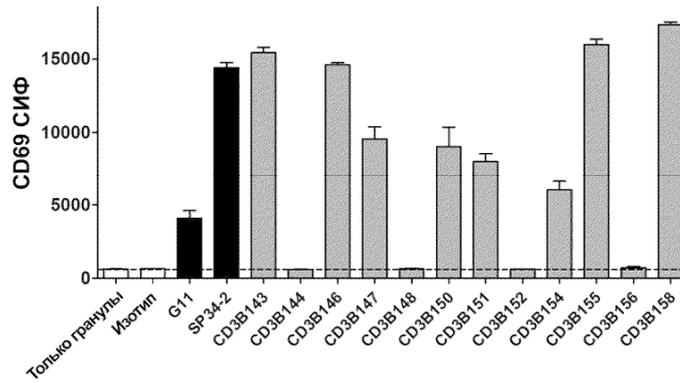
Фиг. 6

Связывание



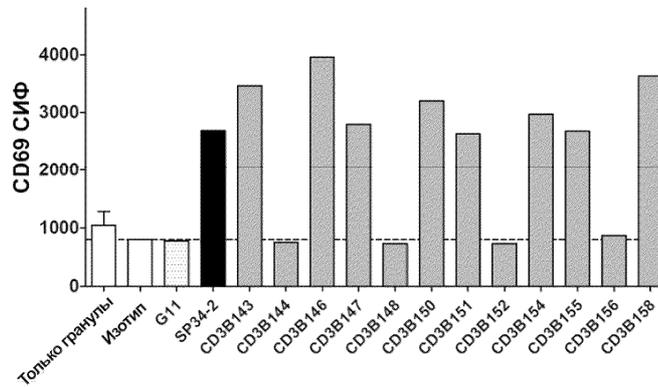
Фиг. 7

Активация



Фиг. 8

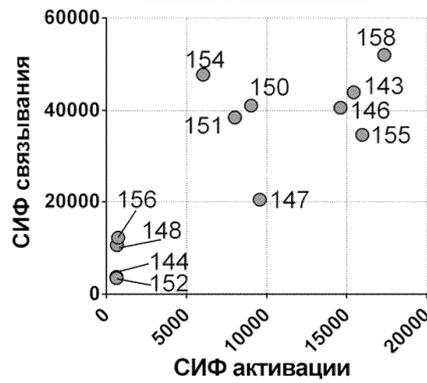
Активация



Фиг. 9

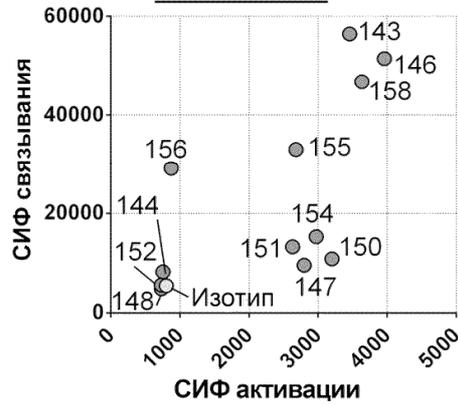
Человек

Связывание в зависимости от активации — человек



Фиг. 10А

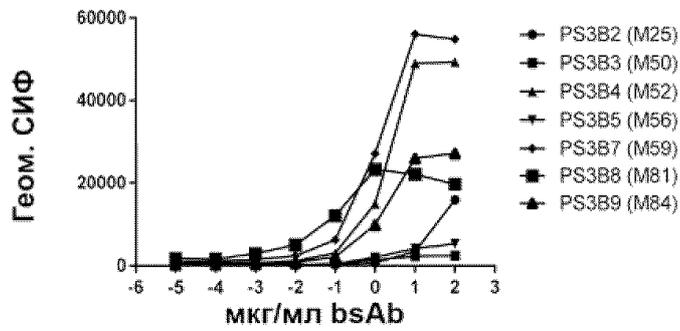
Яванский макак
 Связывание в зависимости от активации —
 яванский макак



Фиг. 10В

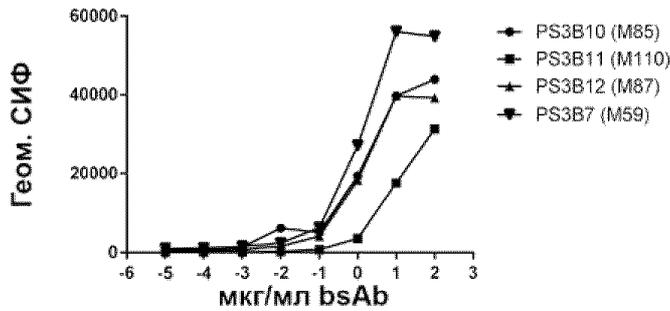
Связывание биспецифического антитела к PSMAxCD3 с клетками LNCaP

LNCaP M201 №1



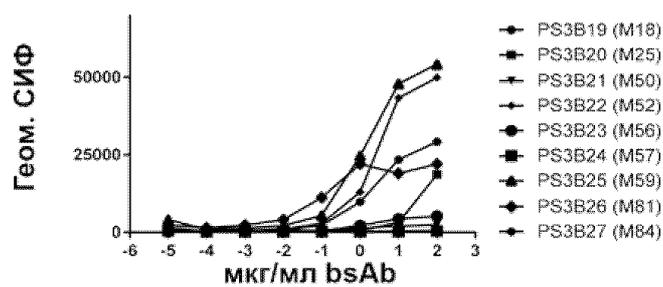
Фиг. 11А

LNCaP M201 №2



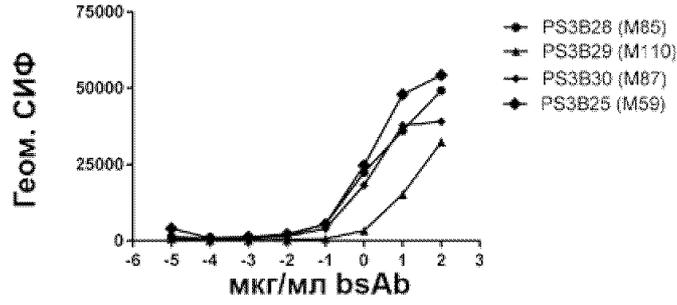
Фиг. 11В

LNCaP M203 №1



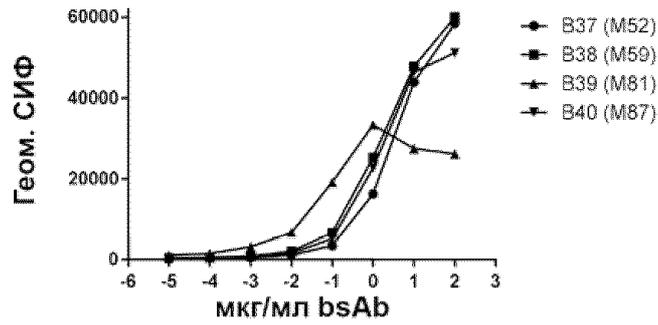
Фиг. 11С

LNCaP M203 №2



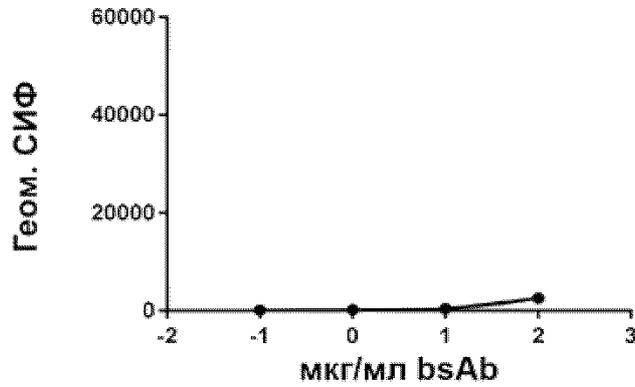
Фиг. 11D

LNCaP PSMA x нуль



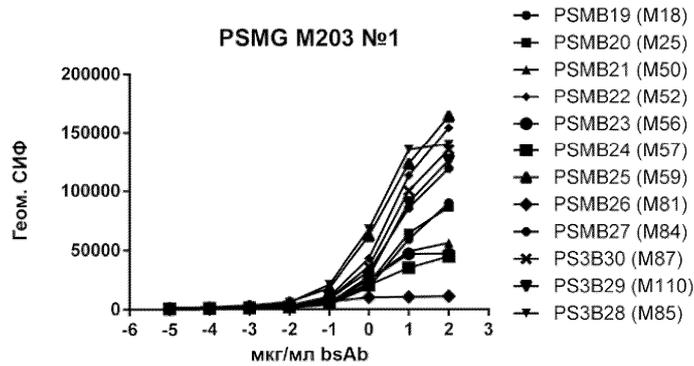
Фиг. 11E

LNCaP CD3 x нуль



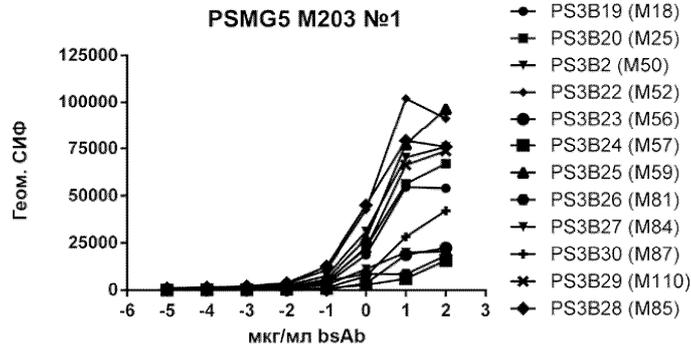
Фиг. 11F

Связывание биспецифических антител PSMA x CD3 с PSMG9 (НЕК шимпанзе)



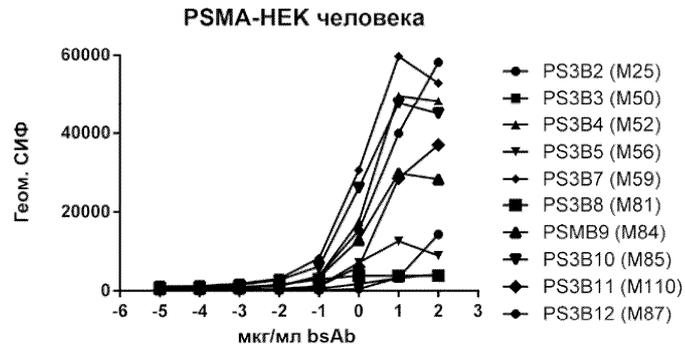
Фиг. 12

Связывание биспецифических антител PSMA x CD3 с PSMG5
(НЕК яванского макака)



Фиг. 13

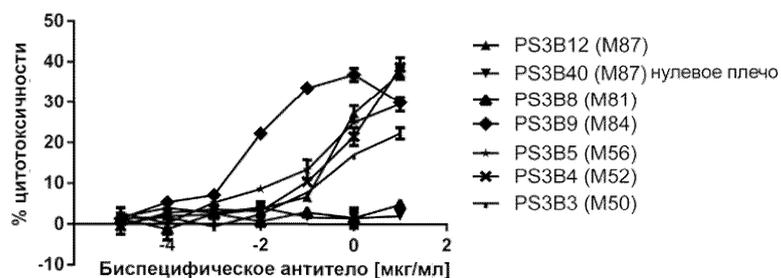
Связывание биспецифических антител к PSMA x CD3 с
PSMA-НЕК человека



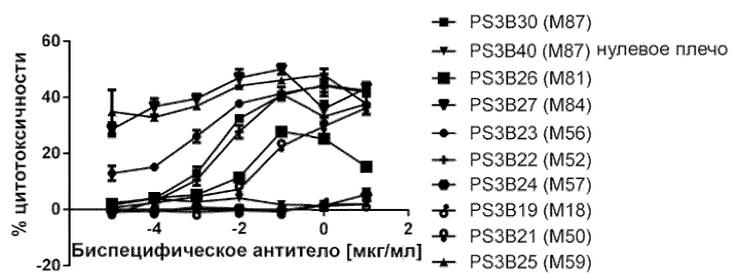
Фиг. 14

Анализ цитотоксичности, опосредованной Т-клетками
PSMA-НЕК человека

Биспецифические цитотоксические
мишени PSMA-НЕК человека 5:1 E:T
(плечи к M201)



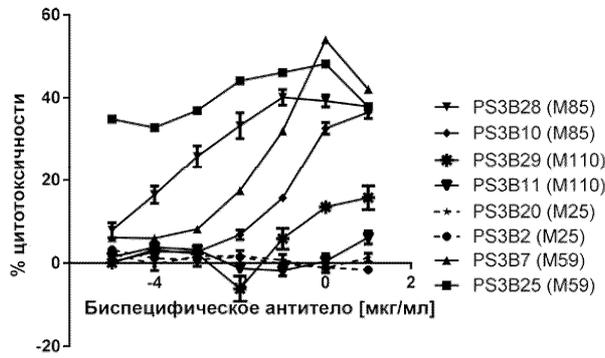
Биспецифические цитотоксические
мишени PSMA-НЕК человека 5:1 E:T
(плечи к M203)



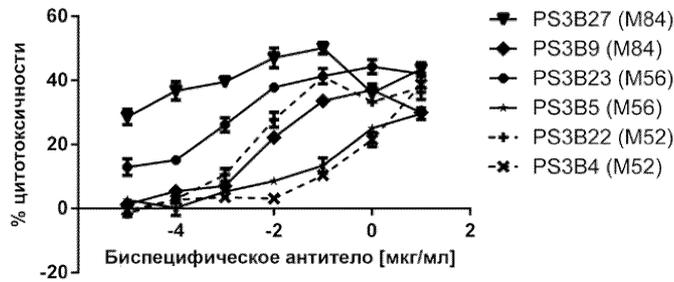
Фиг. 15

Сравнение плеч к CD3 в анализе цитотоксичности в PSMA-HEK человека

Биспецифические цитотоксические мишени PSMA-HEK человека 5:1 E: T

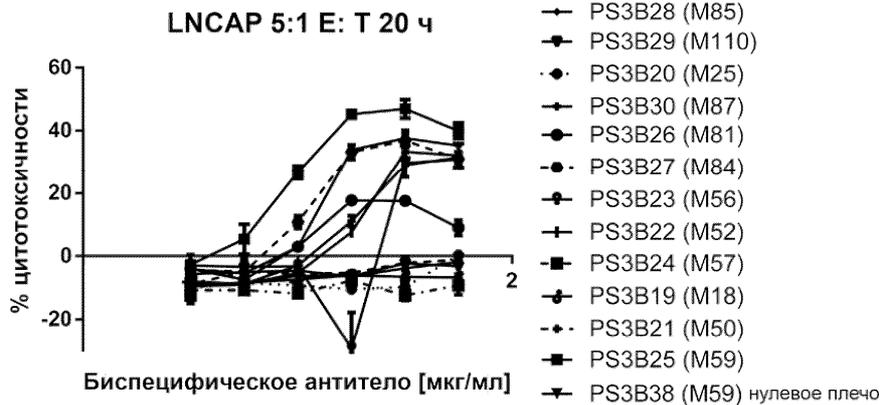


Биспецифические цитотоксические мишени PSMA-HEK человека 5:1 E: T



Фиг. 16

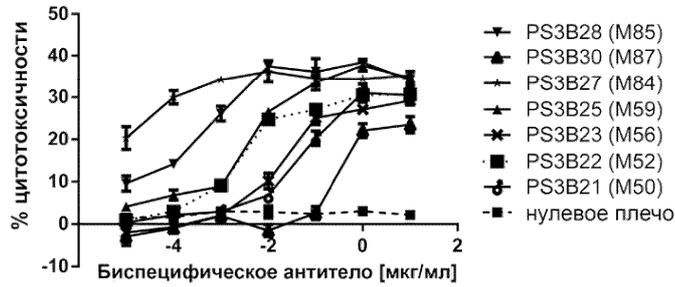
Клетки LNCAP в анализе опосредованной T-клетками цитотоксичности



Фиг. 17

Клетки PSMA-НЕК яванского макака в анализе опосредованной Т-клетками цитотоксичности

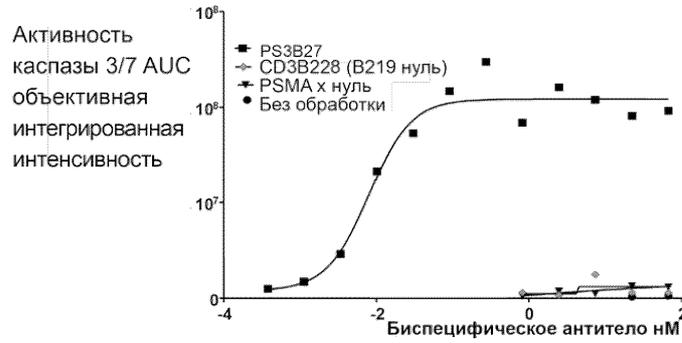
PSMG5 (яванского макака), 5:1 Е: Т 20 ч



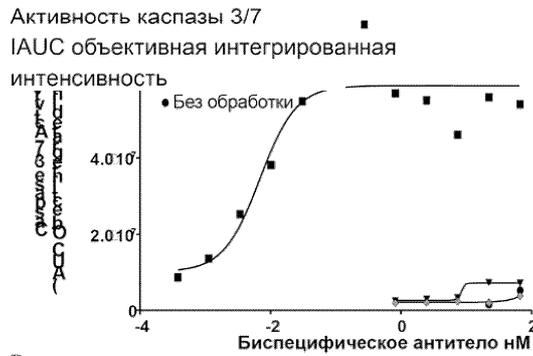
Фиг. 18

Зависимый от Т-клеток ELM каспазы 3/7 апоптоз PSMA в отношении экспрессии клеточных линий НЕК

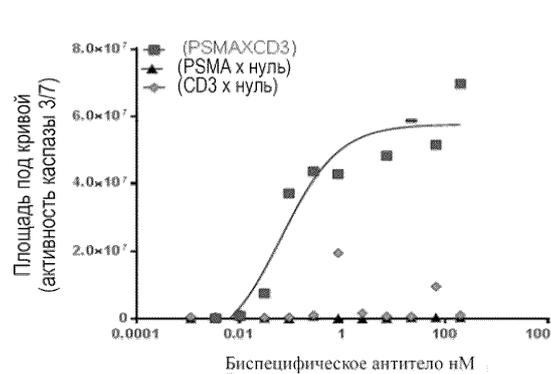
А) PSMA-НЕК человека



В) PSMA-НЕК яванского макака (PSMG5)

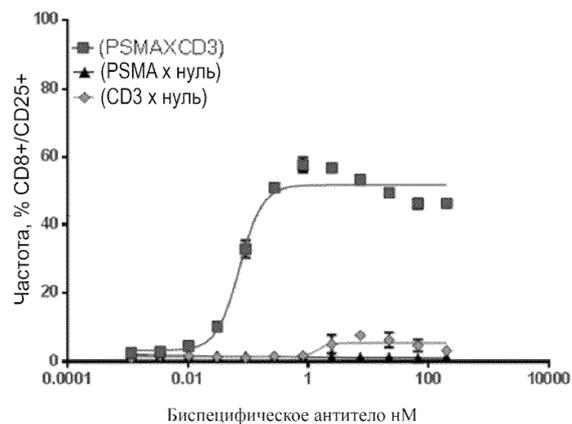


С) LNCaP



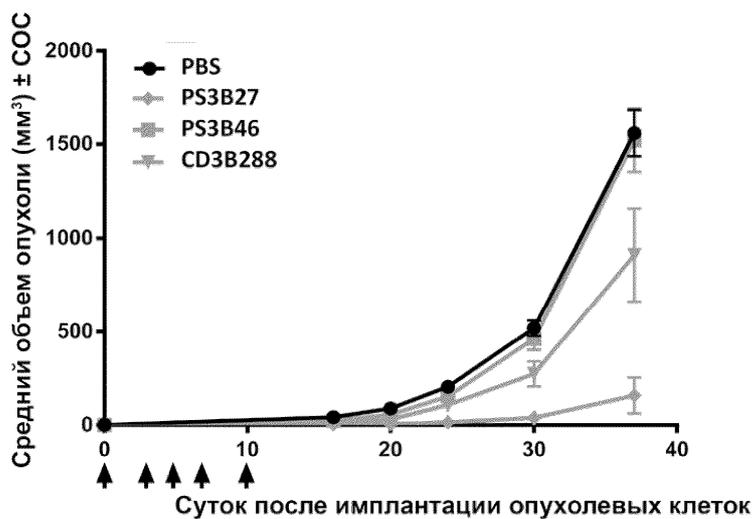
Фиг. 19

Т-клеточная активация PS3B27



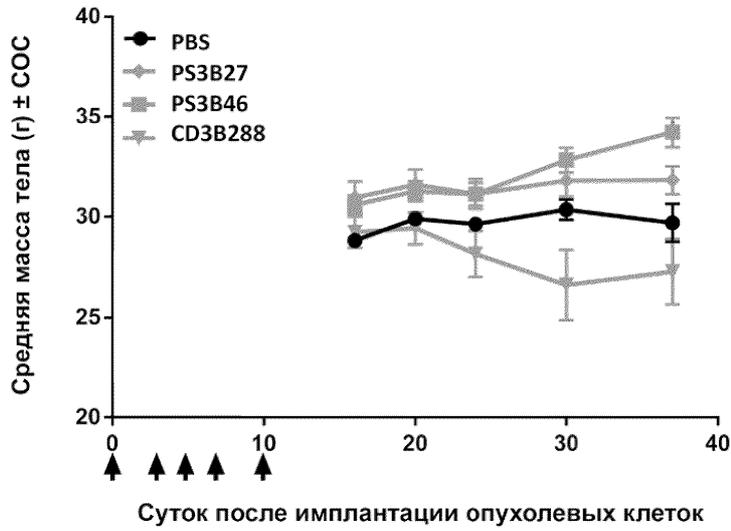
Фиг. 20

Предотвращение онкогенеза в ксенотрансплантатах НЕК293-PSMA, обработанных PS3B27, у мышей линии NSG, гуманизированных человеческими мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC).



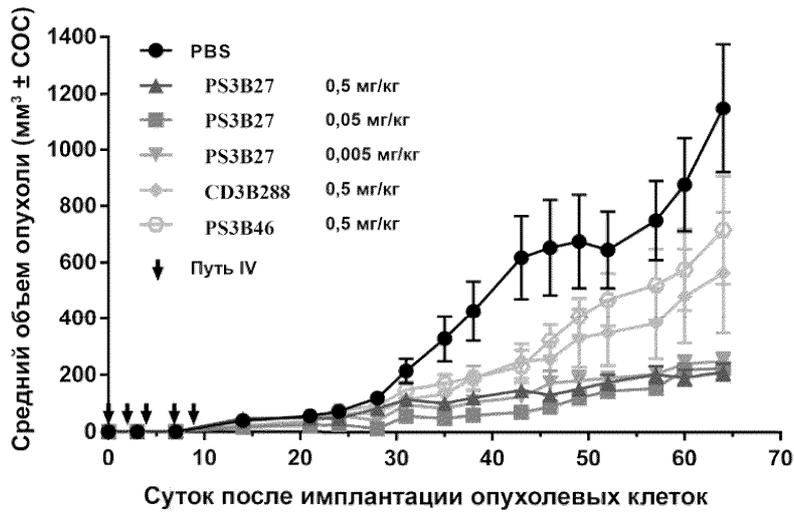
Фиг. 21

Средние массы тела мышей NSG, гуманизированных PBMC, несущих ксенотрансплантаты HEK293-PSMA, после лечения



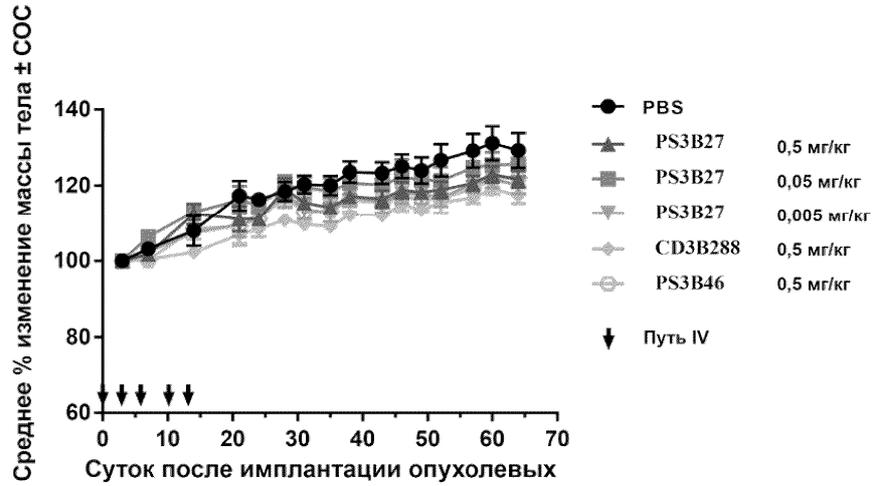
Фиг. 22

Эффективность PS3B27 в предотвращении онкогенеза в смеси ксенотрансплантатов клеток HEK293-PSMA/T-клеток у самцов бестимусных мышей CD1.



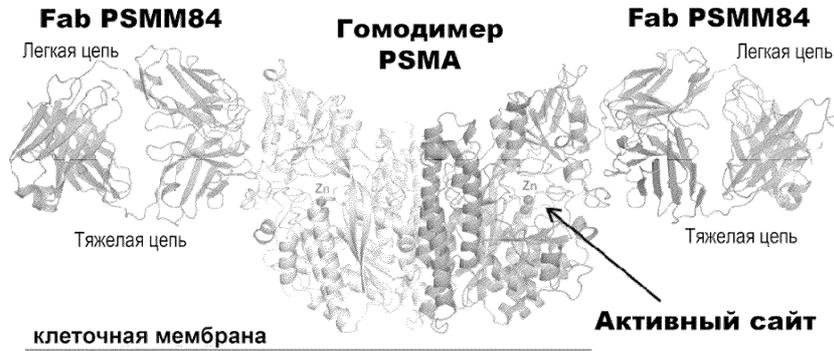
Фиг. 23

Масса тела самцов бестимусных мышей CD1, несущих ксенотрансплантаты клеток НЕК293-PSMA/Т-клеток, обработанных PS3B27



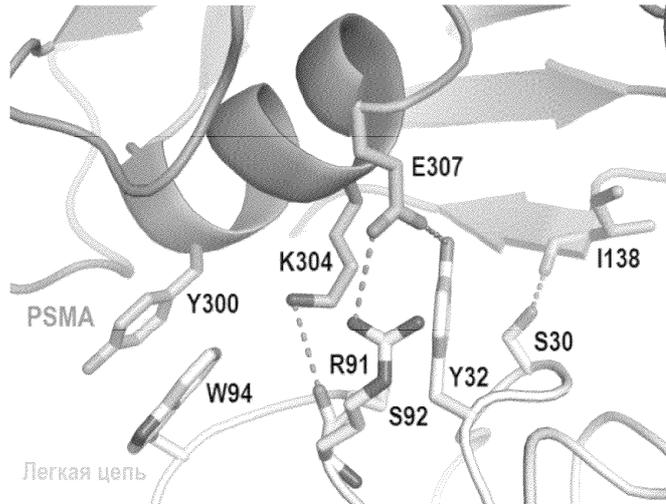
Фиг. 24

Общая структура Fab PSMB83 (также известного как PSMM84), связанного с PSMA



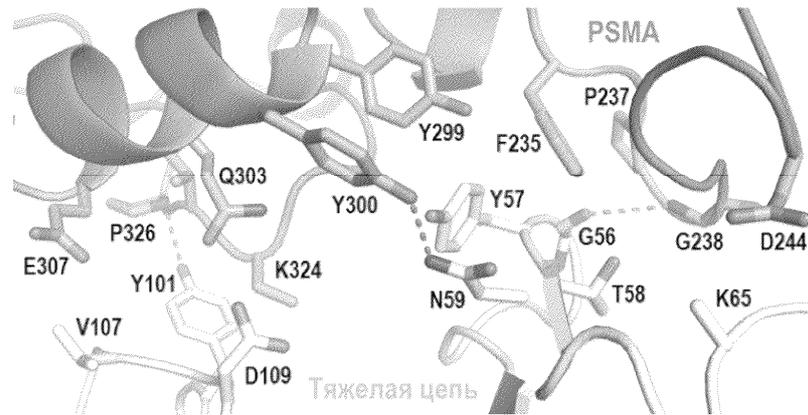
Фиг. 25

Вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с легкой цепью PSMB83 (также известного как PSMM84)



Фиг. 26

Вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с тяжелой цепью PSMB83 (также известного как PSMM84)



Фиг. 27

Остатки эпитопа PSMB83 (также известного как PSMM84)

PSMA человека	(1)	MWNLHETDSAVATARRRWLCAGALVLAG-GFFLLGFLFGWFIKSSNEAT-NITPKHNKAFLDLKAENIKKFLYNTQI PHLAGTEQNFQL
PSMA мыши	(1)	MWNLQDRDSEVLGHRQWLRVGTLVLALGTGFLIGFLFGWFIKPSNEATGNVSHSGMKKEFLHELKAENIKKFLYNTFTRPHLAGTQNNFEL
PSMA яванского макака	(1)	MWNLHETDSAVATARRRWLCAGALVLAG-GFFLLGFLFGWFIKSSSEAT-NITPKHNKAFLDLKAENIKKFLHNFQI PHLAGTEQNFQL
PSMA человека	(93)	AKQIQSQWKEFGLDSELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGLVYVNYARTEDFF
PSMA мыши	(95)	AKQIHDQWKEFGLDLVELSHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFKTSLSQFPFGYENISDVVPPYSAFSPQGTPEGDLVYVNYARTEDFF
PSMA яванского макака	(93)	AKQIQSQWKEFGLDSELVTHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPFPAGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGLVYVNYARTEDFF
PSMA человека	(187)	KLERDMKINCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFA PGVRSYFDG WNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEAAYR
PSMA мыши	(189)	KLEREMKISCSGKIVIARYGKVFGRGNMVKNAQLAGAKGMILYSDPADYFV PAVRSYFDG WNLPGGGVQRGNVNLNLNGAGDPLTPGYPANEAAYR
PSMA яванского макака	(187)	KLERDMKINCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGATGVILYSDPADYFA PGVRSYFDG WNLPGGGVQRGNILNLNLNGAGDPLTPGYPANEAAYR
PSMA человека	(281)	RGIAEAVGLPSIPVHPIC YD DAQKLE EM GGSPAPDSSWRGSLK V YVNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA мыши	(283)	HELTNAVGLPSIPVHPIC YD DAQKLE EM GGSPAPDSSWGGSLK V YVNVGPGFAGNFSTQKVKMHIHSTYKVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA яванского макака	(281)	RGMAEAVGLPSIPVHPIC YD DAQKLE EM GGSSAPDSSWRGSLK V YVNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTSEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA человека	(375)	GGHRDSWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCFP
PSMA мыши	(377)	GGHRDAWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKKGRPRRTILFASWDAEEFGLLGGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCFP
PSMA яванского макака	(375)	GGHRDSWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCFP
PSMA человека	(469)	LMYSLVYNTKELQSPDEGFEKSLYESWTKKSPSPFSGMPRI SKL SGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWTNKFSSGYPLYHSVYETVELV
PSMA мыши	(471)	LMYSLVYNTKELQSPDEGFEKSLYDSWKEKSPSPFEGMPRI SKL SGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWTNKFSSGYPLYHSVYETVELV
PSMA яванского макака	(469)	LMYSLVYNTKELQSPDEGFEKSLYESWTKKSPSPFSGMPRI SKL SGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWTNKFSSGYPLYHSVYETVELV
PSMA человека	(563)	EKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELEANSIVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYISIMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKFSERLQDFDKS
PSMA мыши	(565)	VKFDYDPTFRYHLTVAQVRGGMVFELEANSIVLFPDCQSYAVALKKYADTIYINISMKHPQEMKAYMISFDSLSFAVNNFTDVASKFNQRLQELDKS
PSMA яванского макака	(563)	EKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELEANSIVLFPDCRDYAVVLRKYADKIYINISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKFSERLQDFDKS
PSMA человека	(657)	NPVILRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVYIYAFSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVVKRQIYVAATFTVQAAAEATLSEVA
PSMA мыши	(659)	NPVILRIMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRRIYIYAFSSHNKYAGESFPGIYDALFDISSKVNASKAWNEVVKRQISIAFTVQAAAEATLREVA
PSMA яванского макака	(657)	NPVILRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVYIYAFSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSQAWGEVVKRQISIAFTVQAAAEATLSEVA

Остатки эпитопа заштрихованы. Дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

Фиг. 28

Остатки паратопа PSMB83 (также известного как PSMM84)

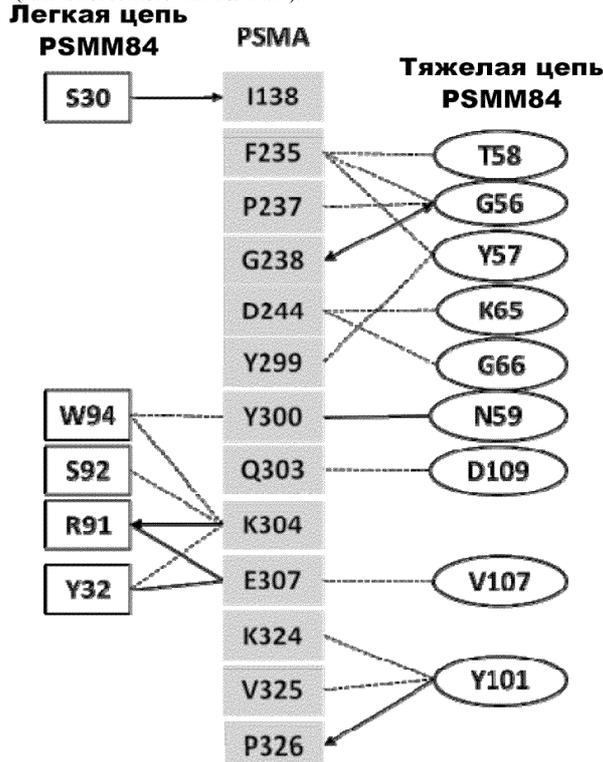
Паратоп PSMM84

PSMM84_HC	(1)	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFTFFKSDAMHWRQAPGKGLEWVSEIISGSGCYTN Y ADSV KG RFTISRDNK
PSMM84_HC	(77)	NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARD S YDSSLY V CDYFDYWGQGLT V TVSSASTKGPVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCL
PSMM84_HC	(153)	VKDYFPPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLOSSGLYLS S SVTV P SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK K VEPKSC
PSMM84_LC	(1)	EIVLTQSPATLSLS P GERATLS C RASQSV S SYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGI P ARFSGSGSGTDFT
PSMM84_LC	(73)	LTISSELPEDFAVYYCQ Q RSN W PLT F FGQGT K VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
PSMM84_LC	(145)	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS T SYLS S STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CDR подчеркнуты. Остатки паратопа затенены.

Фиг. 29

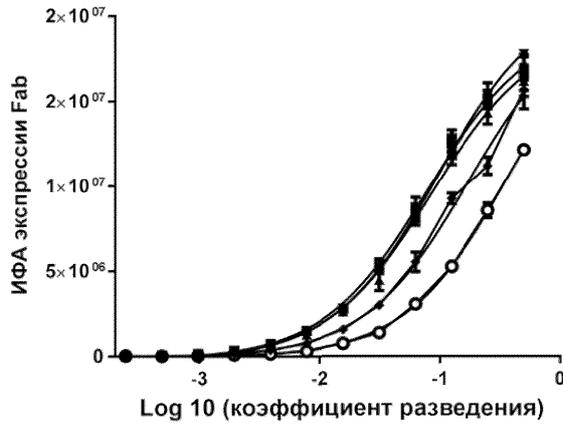
Карта взаимодействия с прямыми контактами, установленными между PSMA и PSMM83 (также известного как PSMM84).



Ван-дер-ваальсовы взаимодействия показаны пунктирными линиями, а водородные связи представлены сплошными линиями со стрелками, указывающими на атомы остова. Отсечение длиной 4 Å использовали для определения контактирующих остатков.

Фиг. 30

Уровни экспрессии Fab

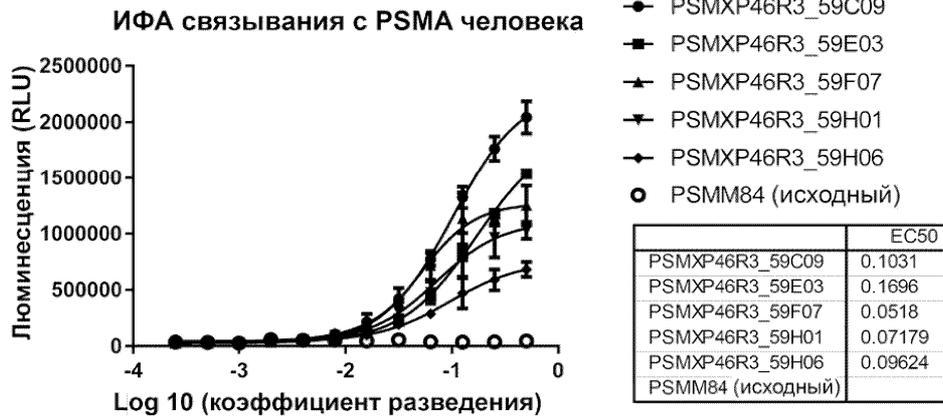


- PSMXP46R3_59C09
- PSMXP46R3_59E03
- ▲ PSMXP46R3_59F07
- ▼ PSMXP46R3_59H01
- ◆ PSMXP46R3_59H06
- PSMM84 (исходный)

	EC50
PSMXP46R3_59C09	0.08489
PSMXP46R3_59E03	0.07847
PSMXP46R3_59F07	0.08431
PSMXP46R3_59H01	0.09494
PSMXP46R3_59H06	0.1727
PSMM84 (исходный)	0.3792

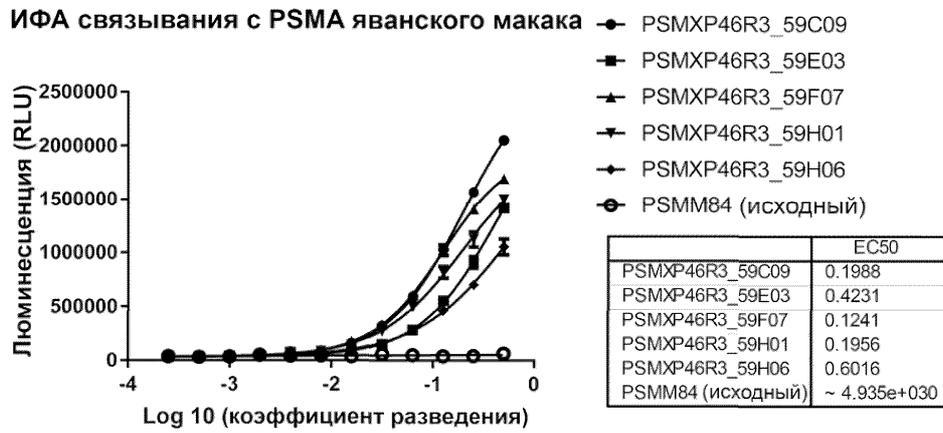
Фиг. 31

Связывание с PSMA человека



Фиг. 32

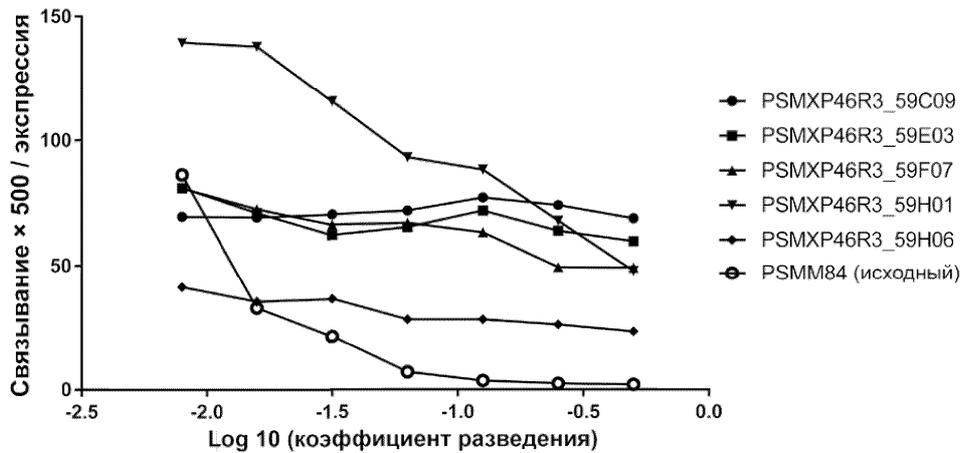
Связывание с PSMA яванского макака



Фиг. 33

Связывание с PSMA человека, нормализованное по экспрессии Fab

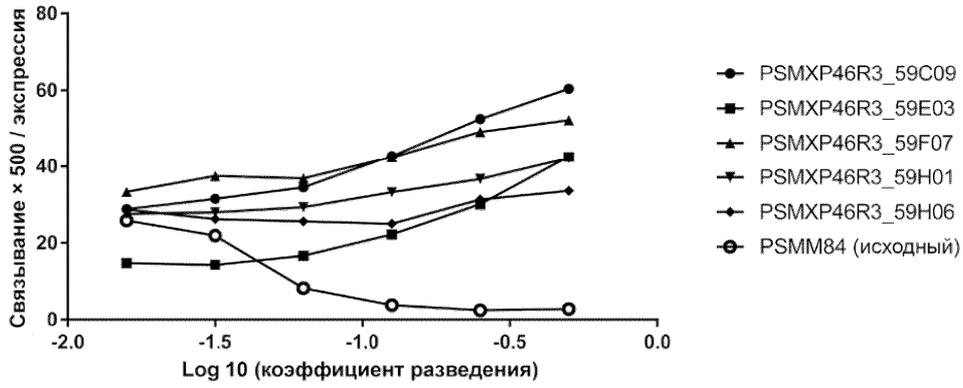
Связывание с PSMA человека, нормализованное по экспрессии Fab



Фиг. 34

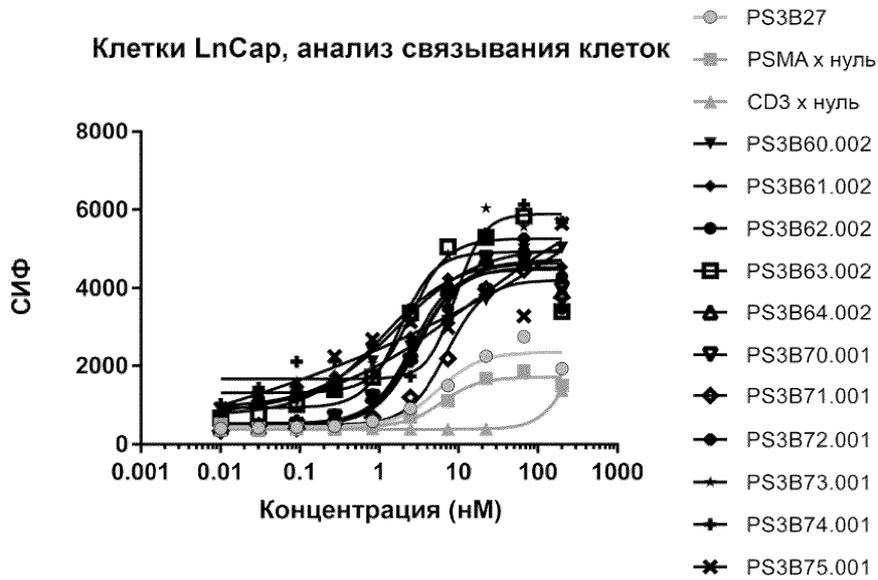
Связывание PSMA яванского макака, нормализовано по экспрессии Fab

Связывание PSMA яванского макака, нормализованное по экспрессии Fab



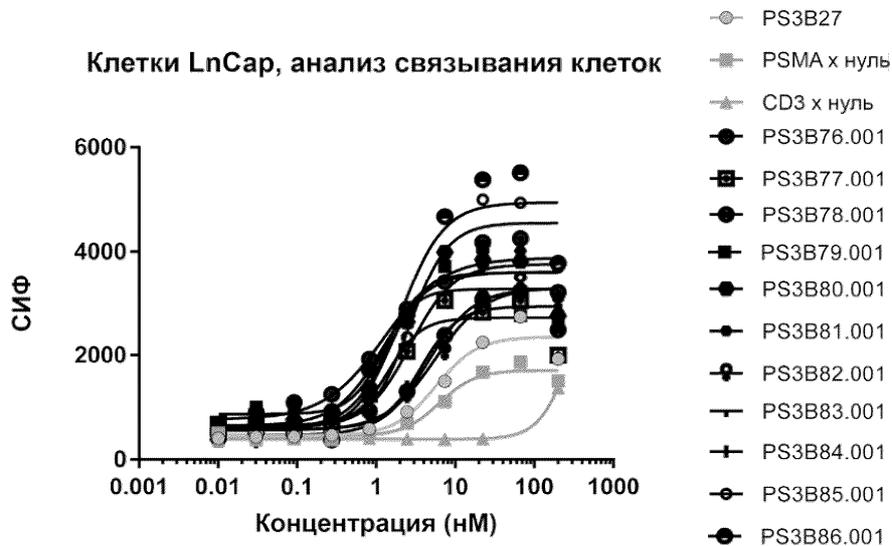
Фиг. 35

Клетки LnCar, анализ связывания клеток

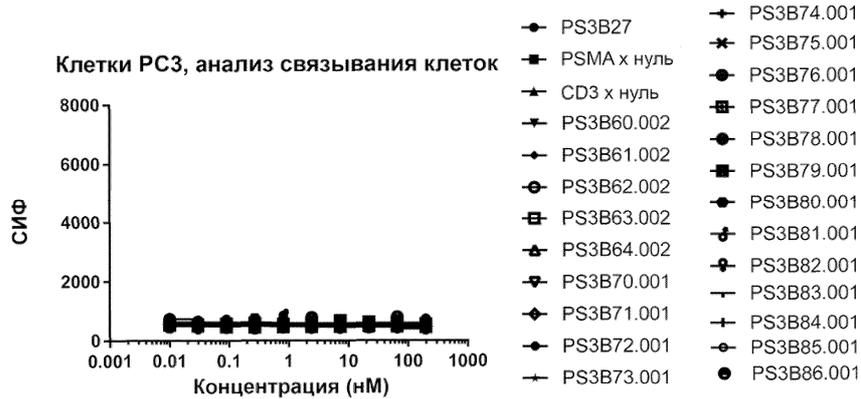


Фиг. 36

Клетки LnCar, анализ связывания клеток

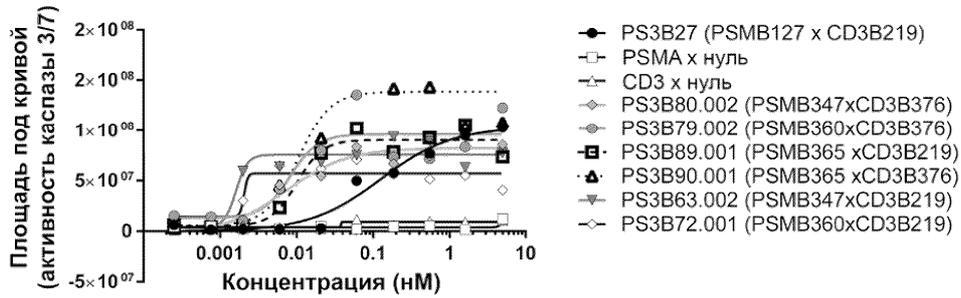


Фиг. 37

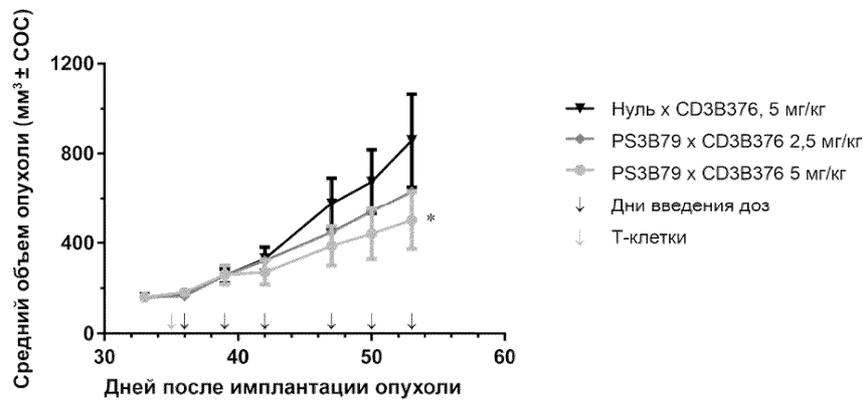


Фиг. 38

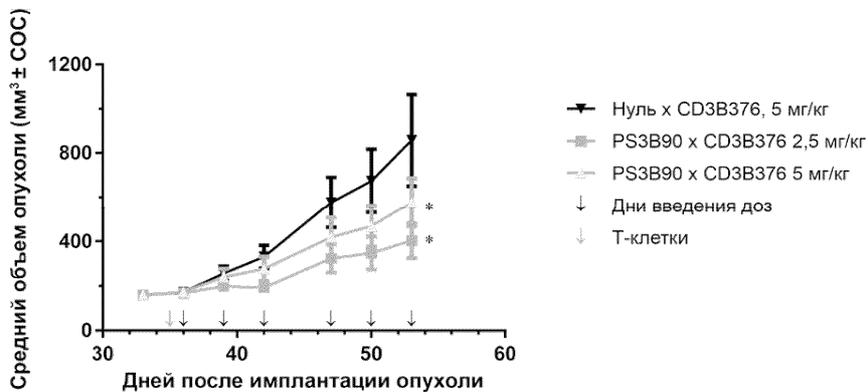
Кривая уничтожения клеток LnCar в течение 72 ч



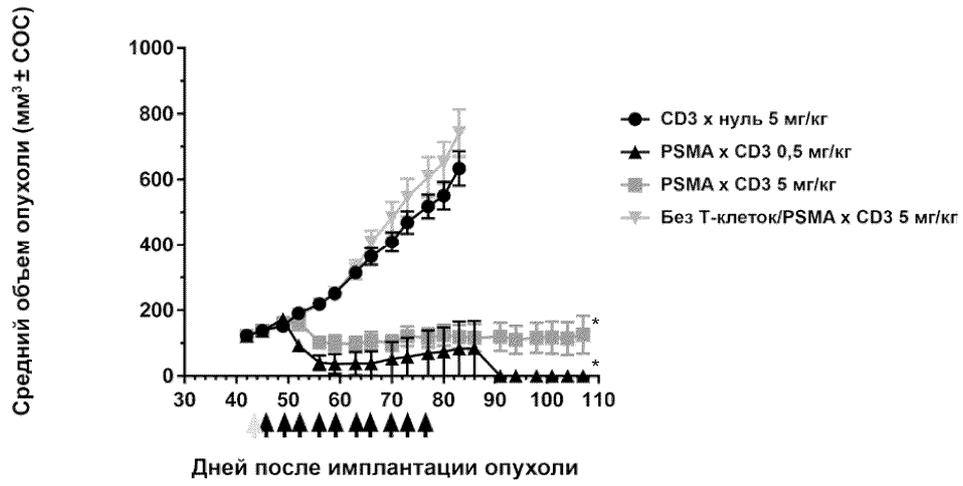
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2