

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047044**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.28

(21) Номер заявки
202292792

(22) Дата подачи заявки
2021.03.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **ТАРГЕТИРУЮЩИЕ КЛАУДИН-6 МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **2020-062881; 2020-073335**

(32) **2020.03.31; 2020.04.16**

(33) **JP**

(43) **2023.01.19**

(86) **PCT/JP2021/013526**

(87) **WO 2021/200939 2021.10.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(72) Изобретатель:
**Иси Синя, Кимура Наоки, Кодама
Тацуси (JP)**

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

(56) **WO-A1-2019111871
WO-A1-2014075697
WO-A1-2019135404**

(57) В настоящем изобретении описаны мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые обладают способностью связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), но не могут связываться с CD3 и CD137 одновременно, и обладают способностью связываться с CLDN6. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, проявляют повышенную зависящую от Т-клетки цитотоксическую активность CLDN6-зависимым образом посредством связывания с CD3/CD17 и CLDN6. В изобретении описано, что мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и их фармацевтические композиции можно применять для таргетинга клеток, экспрессирующих CLDN6, применяемого в иммунотерапии для лечения различных видов рака, прежде всего ассоциированных с CLDN6, таких как CLDN6-позитивные виды рака.

047044
B1

047044
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее описание относится к таргетирующим клаудин-6 мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, их применениям и т.п.

Предпосылки создания изобретения

Семейство клаудинов представляет собой семейство клеточных мембранных белков с молекулярной массой примерно 23 кДа, которые имеют четыре трансмембранных домена и образуют плотные контакты. Семейство клаудинов включает 24 члена у человека и мышей, и известно, что каждый член семейства клаудинов обладает совершенно уникальной схемой экспрессии в зависимости от каждого типа эпителиальных клеток (NPL 1-NPL 4). В слое эпителиальных клеток механизм действия включает предупреждение просачивания (диффузии) субстанций в межклеточные пространства, и установлено, что системы адгезии по типу клетка-клетка, которые называют плотными контактами, фактически играют центральную роль в качестве "барьера" в механизме предупреждения просачивания.

Для клаудина 6 (CLDN6), представляющего собой молекулу плотного контакта, который является членом семейства белков клаудинов, характерна транскрипционно молчащая экспрессия в здоровых тканях взрослых особей (NPL 5 и NPL 6), но обнаружена повышающая регуляция при некоторых типах рака, таких как рак яичника, NSCLC и рак желудка (NPL 7-NPL 9).

Касательно антител к CLDN6, описаны моноспецифические антитела против CLDN6, которые обладают ADCC-активностью или интернализирующей активностью в отношении CLDN6-позитивных линий рака (PTL 1-PTL 5). К настоящему времени сконструированы таргетирующие CLDN6 перенаправляющие Т-клетки биспецифические антитела, обозначенные как 6PHU3, с использованием биспецифического sc(Fv)₂-формата с анти-CD3/анти-CLDN6 специфичностями (PTL 6-PTL 7). Опубликованы данные доклинического исследования, согласно которым 6PHU3 обладает эффективным цитолитическим действием в отношении раковых клеток *in vitro* и *in vivo* (NPL 10).

Перечень процитированных документов.

Патентная литература.

[PTL 1] WO 2009/087978.

[PTL 2] WO 2011/057788.

[PTL 3] WO 2012/003956.

[PTL 4] WO 2012/156018.

[PTL 5] WO 2015/069794.

[PTL 6] WO 2014/075697.

[PTL 7] WO 2014/075788.

Непатентная литература.

[NPL 1] Furuse и Tsukita, TRENDS in Cell Biology 16, 2006, с. 181.

[NPL 2] Wilcox и др., Cell 104, 2001, с. 165.

[NPL 3] Rahner и др., GASTROENTEROLOGY 120, 2001, с. 411.

[NPL 4] Morita и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1999, с. 511.

[NPL 5] Dev Dyn. 231(2), октябрь 2004 г., сс. 425-431.

[NPL 6] Am J Physiol Renal Physiol. 291(6), декабрь 2006 г., F1132-41.

[NPL 7] Int J Cancer. 135(9), 1 ноября 2014 г., сс. 2206-2214.

[NPL 8] Histopathology. 61(6), декабрь 2012 г., сс.1043-1056.

[NPL 9] J Gastrointest Cancer. 41(1), март 2010 г., сс. 52-59.

[NPL 10] Oncoimmunology. 5(3), 29 октября 2015 г., e1091555.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача, положенная в основу изобретения

Объектом настоящего изобретения является создание мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, которые могут эффективно и специфически осуществлять рекрутинг Т-клеток к раковым клеткам-мишеням, прежде всего CLDN6-экспрессирующим клеткам, таким как раковые клетки, и позволяют лечить рак посредством цитотоксической активности Т-клеток в отношении раковых тканей-мишеней, содержащих CLDN6-экспрессирующие клетки; способы получения антигенсвязывающих молекул; и фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы в качестве действующего вещества. В изобретении предложены также способы получения антигенсвязывающих молекул, которые индуцируют зависящую от Т-клеток цитотоксичность более эффективно, но в то же время не имеют проблем, связанных с неблагоприятной токсичностью или побочными действиями, которыми могут обладать из-

вестные из существующего уровня техники мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Решение задачи

В частности, в настоящем описании представлена антигенсвязывающая молекула, которая содержит: первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно (т.е. обладает способностью к двойному связыванию CD3 и CD137, но не одновременно); и второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с молекулой, которая специфически экспрессируется в раковой ткани, в частности, клаудином-6 (CLDN6).

Важно отметить, что благодаря способности к двойному связыванию с CD137 помимо способности связываться с CD3, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, проявляет повышенную зависящую от Т-клеток цитотоксическую активность, обусловленную синергетической передачей сигналов коstimулятором CD137 в ответ на сигнал CD3, по сравнению с биспецифическим антителом, рекрутирующим Т-клетки, которое связывается только с CD3. Кроме того, поскольку связывание антигенсвязывающей молекулы с CD3 и CD137 является не одновременным (т.е. не происходит связывание с CD3 и CD137 одновременно), то не может происходить одновременное связывание с CD3 и/или CD137, которые экспрессируются на различных иммунных клетках (например, Т-клетках), одной и той же антигенсвязывающей молекулы, тем самым устраняются опасения по поводу системной токсичности из-за нежелательного перекрестного связывания между различными иммунными клетками, которое считается ответственным за побочные реакции при введении *in vivo* канонической мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, способной одновременно связываться с CD3, и второй молекулы, экспрессируемой на Т-клетках (например, CD137).

Кроме того, путем создания и повышения связывающей активности в отношении CD137 без нежелательного воздействия на двойную связывающую активность в отношении CD3 антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем описании, при создании изобретения отобраны из более чем 1000 вариантов антигенсвязывающие молекулы, содержащие специфические определяющие комплементарность участки тяжелых цепей (HCDR) или переменные области тяжелых цепей (VH), в сочетании со специфическими определяющими комплементарность участками легких цепей (LCDR) или переменными областями легких цепей (VL), для которых характерно превосходство касательно зависящей от Т-клеток цитотоксической активности в отношении опухолей зависящим от ракового антигена (CLDN6) образом. При его создании неожиданно было установлено, что благодаря разработке оптимального профиля связывания с CD3 и CD137 согласно одному из объектов изобретения, отобранные антигенсвязывающие молекулы проявляли сильную зависящую от Т-клеток цитотоксическую активность в сочетании с низкой токсичностью.

И, наконец, общей проблемой при разработке мультиспецифических антител было получение мультиспецифических конструкций антител в количестве, достаточном для клинического применения, и имеющих требуемую чистоту, из-за ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей антител различной специфичности при совместной экспрессии, что снижает выход правильно собранной конструкции и приводит к образованию большого количества нефункциональных побочных продуктов, от которых может быть сложно отделять требуемое мультиспецифическое антитело. Согласно одному из объектов изобретения посредством тщательного конструирования антител и дизайна молекулярного формата (включая заряженные мутации в константной области, VH/VL-обмен и выбор Fc-области) при создании настоящего изобретения получены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предназначенные для активации и переориентации Т-клеток, которые сочетают хорошую противораковую эффективность и низкую токсичность с благоприятной стабильностью, технологичностью/воспроизводимостью и структурной гомогенностью.

В результате всех вышеуказанных действий получали антигенсвязывающие молекулы и их фармацевтические композиции, которые можно применять для таргетинга клеток, экспрессирующих CLDN6, для применения в иммунотерапии для лечения различных видов рака, прежде всего ассоциированных с CLDN6, таких как CLDN6-позитивные опухоли.

Более конкретно, в настоящем описании предложены следующие варианты.

[1-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6).

[2-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(a1)-(a4):

(a1) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR)1, имеющий SEQ ID NO: 9, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 15, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 21, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 35, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 39;

(a2) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 10, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 16, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 22, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:31, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 35, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 39;

(a3) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 11, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 17, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 23, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40;

(a4) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 12, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 18, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 24, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40.

[2-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[2-1], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(б1)-(б3):

(б1) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(б2) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(б3) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[2-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудин-6 (CLDN6);

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(б1)-(б3):

(б1) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(б2) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(б3) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[2-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[2-1]-[2-3], в которой вариабельные области антитела, содержащиеся в первом и/или втором антигенсвязывающих фрагментах, содержат каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизованного антитела.

[2-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудин-6 (CLDN6);

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(в1)-(в4):

(в1) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

NO: 20, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(62) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(63) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[2-10] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(61)-(63):

(61) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(62) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(63) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[2-11] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[2-8]-[2-10], в которой вариабельные области антитела, содержащиеся в первом и/или втором антигенсвязывающих фрагментах, содержат каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизованного антитела.

[2-12] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(в1)-(в4):

(в1) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в2) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в3) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(в4) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

[2-13] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[2-12], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(г1)-(г3):

(г1) третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(г2) третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(г3) третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[2-14] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

NO: 19, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(63) третью переменную область антитела, которая определяет комплементарность участка (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[2-18] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[2-15]-[2-17], в которой переменные области антитела, содержащиеся в первом и/или втором антигенсвязывающих фрагментах, содержат каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизованного антитела.

[2-19] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD137; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(в1)-(в4):

(в1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в3) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(в4) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

[2-20] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[2-19], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(г1)-(г3):

(г1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(г2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(г3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[2-21] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD137; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, указанных ниже в пп.(г1)-(г3):

(г1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(г2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(г3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[2-22] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая один из вариантов, указанных ниже в пп.(в1)-(в4):

(в1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

(в2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

[2-27] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая один из вариантов, указанных ниже в пп.(б1)-(б3):

(б1) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(б2) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(б3) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

[3-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[2-27], которая содержит дополнительно:

(III) Fc-домен, обладающий пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

[3-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[3-1], в которой Fc-домен состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые способны к стабильной ассоциации.

[3-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[3-2], в которой Fc-домен содержит варианты, указанные ниже в п. (д1) или п. (д2):

(д1) первую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(д2) первую субъединицу Fc-области, содержащую Glu в положении 439, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Lys в положении 356;

где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

[3-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[3-2] или пп.[3-3], в которой первая и/или вторая субъединица Fc-области содержит(ат) варианты, указанные ниже в п. (е1) или п. (е2):

(е1) Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

(е2) Ala в положении 234, Ala в положении 235 и Ala в положении 297;

где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

[3-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[3-2]-[3-4], в которой Fc-домен обладает также более сильной аффинностью связывания с человеческим FcRn по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

[3-6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по пп.[3-5], в которой первая и/или вторая субъединица Fc-области содержит(ат) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440,

где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

[3-7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[2-1]-[2-27], в которой первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй тяжелой цепи, четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй легкой цепи, в которой константные области содержат один из вариантов, указанных ниже в пп.(ж1)-(ж7):

(ж1) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88;

(ж2) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86;

(ж3) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит ами-

которой второй антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с человеческим CLDN6.

[5-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[3-7] или [4-4], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с человеческим CLDN6, представленным в SEQ ID NO: 196 или 197.

[5-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[3-7] или [4-4], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент практически не связывается с человеческим CLDN9.

[5-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[3-7] или [4-4], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент практически не связывается с человеческим CLDN4.

[5-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[3-7] или [4-4], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент практически не связывается с человеческим CLDN3.

[5-6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.[1-1]-[3-7] или [4-4], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент практически не связывается с мутантом CLDN6, представленным в SEQ ID NO: 205.

[6-1] Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.[1-1]-[5-6].

[6-2] Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по пп.[6-1].

[6-3] Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина по пп.[6-2] так, чтобы получать мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

[6-4] Способ по пп.[6-3], дополнительно включающий выделение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы из культуры клетки-хозяина.

[7-1] Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.[1-1]-[5-6] и фармацевтически приемлемый носитель.

[7-2] Фармацевтическая композиция по пп.[7-1], представляющая собой фармацевтическую композицию, применяемую для лечения и/или предупреждения рака.

[7-3] Фармацевтическая композиция по пп.[7-2], где рак содержит экспрессирующие CLDN6 клетки.

[7-4] Фармацевтическая композиция по пп.[7-2] или пп.[7-3], где рак представляет собой рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоль из половых клеток.

[7-5] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.[1-1]-[5-6] для приготовления лекарственного средства.

[7-6] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.[1-1]-[5-6] для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или предупреждения рака.

[7-7] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.[1-1]-[5-6] для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или предупреждения рака, который содержит экспрессирующие CLDN6 клетки.

[7-8] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.[1-1]-[5-6] для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения и/или предупреждения рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака печени, рака эндометрия или опухоли из половых клеток.

[7-9] Способ лечения индивидуума, который имеет рак, включающий введение индивидууму в эффективном количестве мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.[1-1]-[5-6].

[7-10] Способ по пп.[7-9], в котором рак содержит экспрессирующие CLDN6 клетки.

[7-11] Способ по пп.[7-9] или пп.[7-10], в котором рак представляет собой рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоль из половых клеток.

[7-12] Набор для применения для лечения и/или предупреждения рака, который содержит по меньшей мере мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.[1-1]-[5-6] и инструкции по применению.

[7-13] Набор по пп.[7-12], где рак содержит экспрессирующие CLDN6 клетки.

[7-14] Набор по пп.[7-12], где рак представляет собой рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоль из половых клеток.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - эпитоп для контактной области Fab H0868L0581 на CD137. Картирование эпитопа в аминокислотной последовательности CD137 (черным цветом обозначены участки, находящиеся на расстоянии менее 3,0 ангстрем, полосками- на расстоянии менее 4,5 ангстрем от H0868L0581);

на фиг. 2 - эпитоп для контактной области Fab H0868L0581 на CD137. Картирование эпитопа в кристаллической структуре (темно-серые сферы: участки, находящиеся на расстоянии менее 3,0 ангстрем, светло-серые палочки: участки, находящиеся на расстоянии менее 4,5 ангстрем от H0868L0581);

на фиг. 3 - иллюстрация различных форматов антител. Представлена аннотация каждой Fv-области из табл. 4 и правила обозначения из табл. 4, табл. 5 и табл. 6. На диаграмме представлены: (а) биспецифические антитела формата 1 + 1, полученные с использованием FAST-Ig; (б) биспецифические антитела формата 1 + 1, полученные с использованием технологии CrossMab;

на фиг. 4 - данные о связывающей активности биспецифических антител анти-CLDN6/CD3 (CS2961 и 6PHU3/TR01) в отношении человеческих белков семейства CLDN (CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9). Связывающую активность биспецифических антител анти-CLDN6/CD3 в отношении трансфектантов BaF3 (hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF и hCLDN9/BaF) оценивали с помощью проточного цитометра в концентрации 15 мкг/мл и отображали в виде гистограммы. KLH/TR01 применяли в качестве отрицательного контроля;

на фиг. 5 - результаты оценки зависящей от Т-клеток цитотоксичности с помощью LDH-анализа;

на фиг. 6 - сравнительный анализ первичной структуры аминокислотных последовательностей человеческого CLDN9 и человеческого CLDN6. Человеческий CLDN9 и человеческий CLDN6 содержат практически одинаковую последовательность во внеклеточном домене 1 за исключением N-концевого остатка (Met/Leu в положении 29). Две аминокислоты во внеклеточном домене 2 в человеческом CLDN9 и человеческом CLDN6 являются различными (Arg/Leu в положении 145 и Gln/Leu в положении 156);

на фиг. 7 - результаты оценки зависящей от Т-клеток цитотоксичности антитела (PPU4135) в отношении различных линий раковых клеток, полученные с помощью LDH-анализа;

на фиг. 8 - полученные в реальном времени результаты анализа ингибирования клеточного роста антителами (CS3348, PPU4135 и PPU4136) в отношении различных линий раковых клеток, полученные с помощью xCELLigence-анализа;

на фиг. 9 - результаты анализа Т-клеточной активации посредством связывания CD3 антителами (CS3348, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138) при совместном культивировании с экспрессирующими CLDN6 линиями клеток человека (OVCAR3 и NCI-H1435) и CLDN6-негативной клеточной линией (5637). KLH/TR01 применяли в качестве отрицательного контроля;

на фиг. 10 - результаты анализа активации NF-каппа В посредством связывания CD137 антителами (CS3348, PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138) при совместном культивировании с экспрессирующими CLDN6 линиями клеток человека (OVCAR3 и NCI-H1435) и CLDN6-негативной клеточной линией (5637). KLH/TR01 применяли в качестве отрицательного контроля;

на фиг. 11 - данные о противоопухолевой активности *in vivo* антител (CS3348, PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138) при применении в дозе 1 мг/кг, полученные с использованием мышиной модели NCI-H1435/HuNOG;

на фиг. 12 - данные о противоопухолевой активности *in vivo* антител (CS3348 и PPU4135) при применении в дозах 0,05 мг/кг и 0,2 мг/кг с использованием мышиной модели OV-90/HuNOG;

на фиг. 13 - данные об изменении уровней AST, ALT, GLDH (печеночные ферменты), ALP, TBIL, GGT, TBA (параметры повреждения гепатобилиарной системы (маркеры гепатотоксичности)) и CRP (маркер воспаления), опосредуемом введением CS3348 или PPU4135.

Описание вариантов осуществления изобретения

Технологии и процедуры, которые описаны или на которые сделаны ссылки в настоящем описании, в целом хорошо известны специалистам в данной области, и их широко применяют с использованием общепринятых методологий, таких, например, как описанные у

Sambrook и др., *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y. 2001; *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. F.M.

Ausubel и др., 2003; серии *Methods in Enzymology*, изд-во Academic Press, Inc.:

PCR 2: A Practical Approach, под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames и G.R. Taylor,

1995, *Antibodies, A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и Lane, 1988 и *Animal*

Cell Culture, под ред. R.I. Freshney, 1987; *Oligonucleotide Synthesis*, под ред. M.J.

Gait, 1984; *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press; *Cell Biology: A*

Laboratory Notebook, под ред. J.E. Cellis, 1998, изд-во Academic Press; *Animal Cell*

Culture, под ред. R.I. Freshney, 1987; J. P. Mather и P.E. Roberts, *Introduction to*

Cell and Tissue Culture, изд-во Plenum Press, 1998; *Cell and Tissue Culture:*

Laboratory Procedures, под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths и D.G. Newell, изд-во J.

Wiley and Sons, 1993-1998; *Handbook of Experimental Immunology*, под ред. D.M.

Weir и C.C. Blackwell; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, под ред. J.M.

Miller и M.P. Calos, 1987; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, под ред. Mullis и

др., 1994; *Current Protocols in Immunology*, под ред. J.E. Coligan и др., 1991; *Short*

Protocols in Molecular Biology, изд-во Wiley and Sons, 1999; C.A. Janeway и P.

Travers, *Immunobiology*, 1997; P. Finch, *Antibodies*, 1997; *Antibodies: A Practical*

Approach, под ред. D. Catty, изд-во IRL Press, 1988-1989; *Monoclonal Antibodies:*

A Practical Approach, под ред. P. Shepherd и C. Dean, изд-во Oxford University

Press, 2000; E. Harlow и D. Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999; *The Antibodies*, под ред. M. Zanetti и J.

D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995; и *Cancer: Principles and*

Practice of Oncology, под ред. V.T. DeVita и др., изд-во J.B. Lippincott Company,

1993.

Представленные ниже с целью иллюстрации определения и подробное описание даны для облегчения понимания настоящего изобретения.

Определения

Аминокислоты.

В настоящем описании для обозначения аминокислот применяли одно- или трехбуквенные коды или оба обозначения, например, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I или Val/V.

Изменение аминокислот.

Для аминокислотного изменения (обозначаемого также в настоящем описании как "аминокислотная замена" или "аминокислотная мутация") в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы можно применять известные методы, такие как сайтнаправленный мутагенез (Kunkel и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1985, сс. 488-492) и ПЦП с перекрывающимися праймерами. Кроме того, можно применять также несколько известных методов в качестве методов изменения аминокислот для замены на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты (*Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 2006, сс. 225-249 и *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (11), 2003, сс. 6353-6357). Например, можно применять бесклеточную систему трансляции (Clover Direct (фирма Protein Express)), которая содержит тРНК, несущую не встречающуюся в естественных условиях аминокислоту, связанную с комплементарной амбер-супрессорной тРНК одного из стоп-кодонов, UAG-кодона (амбер-кодон).

В настоящем описании значение понятия "и/или", применяемого для описания сайта аминокислотного изменения, включает каждую из комбинаций, в которой можно объединять "и" и "или". Например, в частности, "заменены аминокислоты в положениях 33, 55 и/или 96" включают следующие варианты аминокислотных изменений: аминокислоты(ы) в (а) положении 33, (б) положении 55, (в) положении 96,

(г) положениях 33 и 55, (д) положениях 33 и 96, (е) положениях 55 и 96 и (ж) положениях 33, 55 и 96.

Кроме того, в настоящем описании в качестве обозначения, характеризующего изменения аминокислот, можно применять соответственно обозначение, в котором перед номером и после номера конкретного положения указаны однобуквенные или трехбуквенные коды аминокислот до и после изменения соответственно. Например, для описания замены содержащейся в варибельной области антителя аминокислоты Asn в положении 100b (согласно нумерации Кэбота) на Leu используют обозначение N100bL или Asn100bLeu. Для номера аминокислотного положения согласно нумерации Кэбота это означает, что написанный перед номером однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту после замены. Аналогично этому, изменение P238D или Pro238Asp, которое используют для обозначения замены аминокислоты в Fc-области, содержащейся в константной области антителя, означает замену Pro в положении 238 (согласно EU-нумерации) на Asp. Для номера аминокислотного положения согласно EU-нумерации это означает, что написанный перед номером однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту после замены.

Полипептиды.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид" относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (которые называют также пептидными связями). Понятие "полипептид" относится к любой цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, и не относится к конкретной длине продукта. Так, понятие "пептиды", "дипептиды", "трипептиды", "олигопептиды", "белок", "аминокислотная цепь" или любое другое понятие, применяемое для обозначения цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, подпадает под определение "полипептид" и понятие "полипептид" можно использовать вместо или взаимозаменяемо с любым из указанных понятий. Подразумевается также, что понятие "полипептид" относится к продуктам пост-экспрессионных модификаций полипептида, включая (но не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид может иметь происхождение из естественного биологического источника или его можно получать методом рекомбинации, но он необязательно транслируется с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым методом, включая химический синтез. Полипептид, указанный в настоящем описании, может иметь размер, составляющий примерно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь трехмерную структуру, хотя они необязательно имеют указанную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называют уложенными (т.е. имеющими укладку), а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, а скорее могут принимать большое количество различных конформаций, называют неукладенными.

Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величины % идентичности аминокислотных последовательностей получали, применяя компьютерную программу для сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться.

В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности A

по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно нее (что в альтернативном варианте можно обозначать как то, что данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно нее), рассчитывают следующим образом: $100 \times \text{дробь } X/Y$, где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, когда с помощью программы осуществляли выравнивание А и Б, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотных последовательностей А относительно Б не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Методы рекомбинации и композиции

Антитела и антигенсвязывающие молекулы можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в патенте США № 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления изобретения является(ются) один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), который(е) содержит(ат) указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными векторами): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp20-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела, представленного в настоящем описании, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанное выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуются гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см. например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo B.K.C, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254 описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, патенты

США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью OB40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (HEK 293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu, в: Methods in Molecular Biology под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Рекомбинантное получение антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, можно осуществлять с помощью методов, аналогичных описанным выше, с использованием клетки-хозяина, которая содержит (например, трансформирована) один или несколько векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую полную антигенсвязывающую молекулу или часть антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие молекулы и мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Понятие "антигенсвязывающая молекула" в контексте настоящего описания относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающий центр, или к любой молекуле, которая обладает связывающей активностью в отношении антигена, и может относиться также к таким молекулам как пептид или белок, состоящий примерно из пяти или большего количества аминокислот.

Пептид и белок не ограничены имеющими происхождение из живого организма, и, например, могут представлять собой полипептид, полученный из искусственно созданной последовательности. Они могут представлять собой также любой полипептид, выбранный из встречающегося в естественных условиях полипептида, синтетического полипептида, рекомбинантного полипептида и т.п. Кроме того, одним из вариантов указанной в настоящем описании антигенсвязывающей молекулы являются каркасные молекулы, которые содержат известную стабильную конформационную структуру, такую как альфа/бета-бочка (-баррель), в качестве каркаса, и в которых часть молекулы входит в состав антигенсвязывающего центра.

Понятие "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются специфически с несколькими антигенами. Понятие "биспецифическая" означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере с двумя различными антигенными детерминантами. Понятие "триспецифическая" означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере с тремя различными антигенными детерминантами.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, представляет собой триспецифическую антигенсвязывающую молекулу, т.е. она обладает способностью специфически связываться с тремя различными антигенами: она обладает способностью связываться либо с CD3, либо с CD137, но не может связываться с обоими антигенами одновременно, и обладает способностью специфически связываться с CLDN6.

Одним из объектов настоящего изобретения, представленным в описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6), предпочтительно человеческим CLDN6.

В одном из объектов настоящего изобретения, представленном в описании, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

Компоненты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, можно сливать друг с другом в различных конфигурациях. Примеры конфигурацией представлены на фиг. 3. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат Fc-домен, который состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

Согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения компоненты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул (например, антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен) можно сливать непосредственно или через различные линкеры, прежде всего пептидные линкеры, которые содержат одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые указаны в настоящем описании или известны в данной области. Предпочтительно неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры (G4S)_n, (SG4)_n, (G4S)_n или G4(SG4)_n, в которых *n*, как правило, обозначает число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

Одним из объектов настоящего изобретения, представленным в описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй тяжелой цепи, четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй легкой цепи.

Одним из объектов настоящего изобретения, представленным в описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6);

в которой первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй тяжелой цепи, четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй легкой цепи, в которой константные области содержат один из вариантов, указанных ниже в пп.(ж1)-(ж7):

(ж1) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88;

(ж2) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86;

(ж3) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;

(ж4) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88;

(ж5) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86;

(ж6) константную область первой тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, константную область первой легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, константную область второй тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, и константную область второй легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;

содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3), и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);

(315) тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1) и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2), и тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (цепь 3), и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);

(316) тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1) и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2), и тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (цепь 3), и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);

(317) тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1) и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (цепь 3), и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);

(318) тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1) и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (цепь 3), и легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4).

Пироглутамилирование.

Известно, что, когда антитело экспрессируется в клетках, то антитело модифицируется после трансляции. Примеры пост-трансляционной модификации включают отщепление лизина на С-конце тяжелой цепи с помощью карбоксипептидазы; модификацию глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи и легкой цепи в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования; гликозилирование; окисление; дезамидирование; и гликирование, и известно, что такие пост-трансляционные модификации встречаются в различных антителах (*Journal of Pharmaceutical Sciences*, т. 97, 2008, сс. 2426-2447).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, включают также мультиспецифическое антитело, которое подвергали пост-трансляционной модификации. Примеры мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, которые подвергали пост-трансляционной модификации, включают мультиспецифические антигенсвязывающие антитела, которые подвергали пироглутамилированию на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делеции лизина на С-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация, представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на С-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (*Analytical Biochemistry*, т. 348, 2006, сс. 24-39).

Антигенсвязывающий фрагмент.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, к которой он присоединен (например, второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например, специфическому типу опухолевой клетки, экспрессирующей раковый антиген (CLDN6). В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью активировать передачу сигналов через его антиген-мишень, например, антиген комплекса Т-клеточного рецептора (CD3) и/или костимуляторную молекулу CD137. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, что дополнительно будет указано в настоящем описании. Конкретные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен или варибельную область антитела, включающую варибельную область тяжелой цепи антитела и варибельную область легкой цепи антитела. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут содержать константные области антитела, что дополнительно будет указано в настоящем описании и известно в данной области. Пригодные константные области тяжелой цепи включают любые из относящихся к пяти изотипам: альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Пригодные константные области легкой цепи включают любые из относящихся к двум изотипам: каппа и ламбда.

В контексте настоящего описания понятия "первый", "второй", "третий" и "четвертый" касательно антигенсвязывающих фрагментов и т.д. применяют для удобства различения, когда присутствует более одного фрагмента каждого типа. Использование этих понятий не предназначено для придания определенного порядка или ориентации мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, если это четко не обозначено.

Антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно (который в настоящем описании

обозначают также как "антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью (Dual)" или первый антигенсвязывающий фрагмент" или "Dual-Ig" или "Dual-Fab"). В конкретном варианте осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит не больше двух антигенсвязывающих фрагментов, которые обладают способностью специфически связываться с CD3 и CD137, но не могут связываться с CD3 и CD137 одновременно. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обеспечивает одновалентное связывание с CD3 или CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью ("первый антигенсвязывающий фрагмент") представляет собой молекулу Fab, прежде всего каноническую молекулу Fab. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью ("первый антигенсвязывающий фрагмент") представляет собой домен, который содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела (VL и VH). Приемлемые примеры указанных доменов, содержащих переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела, включают "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv 2 (scFv2)", "Fab", "F(ab')2" и т.д.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью ("первый антигенсвязывающий фрагмент") специфически связывается с полным пептидом или с частью неполного пептида CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 обезьян циномоглус, более конкретно человеческий CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент обладает перекрестной реактивностью (т.е. специфически связывается с) CD3 человека и обезьян циномоглус. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью специфически связываться с эпсилон-субъединицей CD3, в частности, эпсилон-субъединицей человеческого CD3, которая представлена в SEQ ID NO: 170 (NP_000724.1) (в скобках представлены регистрационные номера RefSeq). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью специфически связываться с эпсилон-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпсилон-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения CD137 представляет собой человеческий CD137. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, включают антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп человеческого CD137, с которым связывается антитело, выбранное из группы, которая состоит из:

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
SPCPPNSFSSAGGQRTCD

ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKG

C (SEQ ID NO: 182),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDC

KQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 181),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
LQDPCSNC

PAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC

(SEQ ID NO: 183), и

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность

LQDPCSNCPAGTFCDNNRN

QIC (SEQ ID NO: 180)

в человеческом белке CD137.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью ("первый антигенсвязывающий фрагмент") содержит любую из последовательностей переменных областей антитела, указанных ниже в пп.(a1)-(a4):

(a1) переменную область тяжелой цепи, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 9, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 15, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 35, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 39;

(a2) переменную область тяжелой цепи, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 10, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 16, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR

и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);
 (к07) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4);
 (к08) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4);
 (к09) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4);
 (к10) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4);
 (к11) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);
 (к12) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);
 (к13) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);
 (к14) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);
 (к15) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);
 (к16) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4);
 (к17) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);
 (к18) тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (цепь 3), и легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, включают также мультиспецифическое антитело, которое подвергали пост-трансляционной модификации. Примеры мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, которые подвергали пост-трансляционной модификации, включают мультиспецифические антигенсвязывающие антитела, которые подвергали пироглутамилированию на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делеции лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация, представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на C-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (*Analytical Biochemistry*, т. 348, 2006, сс. 24-39).

Антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CLDN6.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CLDN6 (которую в контексте настоящего описания обозначают также как "связывающий антиген CLDN6 фрагмент" или "второй антигенсвязывающий фрагмент"). В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит один антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CLDN6.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент"), как правило, представляет собой молекулу Fab, в частности, молекулу канонического Fab. В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") представляет собой домен, который содержит вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела (VL и VH). Приемлемые примеры указанных доменов, содержащих вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела, включают "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv 2 (scFv2)", "Fab", "F(ab')₂" и т.д.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") специфически связывается с полным пептидом или с частью неполного пептида CLDN6. В конкретном варианте осуществления изобретения CLDN6 представляет собой CLDN6 человека или CLDN6 обезьян циномоглус, или CLDN6 мышей, наиболее конкретно человеческий CLDN6. В конкретном варианте осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") обладает перекрестной реактивностью (т.е. специфически связывается с) CLDN6 человека и обезьян циномоглус.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") специфически связывается с первым внеклеточным доменом CLDN6 (аминокислоты 29-81 SEQ ID NO: 196 или 197) или вторым внеклеточным доменом CLDN6 (аминокислоты 138-159 SEQ ID NO: 196 или 197). В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") специфически связывается с человеческим CLDN6, который экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В

конкретных вариантах осуществления изобретения связывающая активность в отношении CLDN6 представляет собой связывающую активность в отношении белка CLDN6, который экспрессируется на поверхности раковых клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") не связывается существенно с человеческим CLDN9.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") не связывается существенно с человеческим CLDN4.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") не связывается существенно с человеческим CLDN3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") не связывается существенно с мутантом CLDN6, представленным в SEQ ID NO:205. В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") представляет собой молекулу кроссовер-Fab, т.е. молекулу Fab, в которой обменены либо переменные, либо константные области тяжелой и легкой цепей Fab.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит переменные области антитела, указанные ниже в п. (б1) или п. (б2):

(б1) переменную область тяжелой цепи, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(б2) переменную область тяжелой цепи, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит переменные области антитела, которые содержат каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизированного антитела.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит варианты, указанные ниже в п. (г1) или п. (г2):

(г1) переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(г2) переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2, и последовательность переменной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 26.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 1, и последовательность переменной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 25.

В конкретных вариантах осуществления изобретения связывающий антиген CLDN6 фрагмент ("второй антигенсвязывающий фрагмент") содержит любой из вариантов, представленных ниже в пп.(л01)-(л09):

(л01) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2);

(л02) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2);

(л03) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2);

(л04) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2);

(л05) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2);

(л06) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2);

(л07) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2);

(л08) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2);

(л09) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, включают также мультиспецифическое антитело, которое подвергали пост-трансляционной модификации. Примеры мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, которые подвергали пост-трансляционной модификации, включают мультиспецифические антигенсвязывающие антитела, которые подвергали пироглутамилированию на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делеции лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация, представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на C-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (*Analytical Biochemistry*, т. 348, 2006, сс. 24-39).

Антиген.

В контексте настоящего описания понятие "антиген" относится к сайту (например, непрерывный участок аминокислот или конформационная конфигурация, состоящая из различных участков несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Важные антигенные детерминанты могут присутствовать, например, на поверхностях опухолевых клеток, на поверхностях инфицированных вирусом клеток, на поверхностях других пораженных заболеванием клеток, на поверхности иммунных клеток, в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). Если не указано иное, то белки, которые рассматриваются в качестве антигенов в настоящем описании (например, CD3, CD137, CLDN6), могут представлять собой любую нативную форму белков из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретном варианте осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий CD3, человеческий CD137 или человеческий CLDN6. В контексте настоящего описания при ссылке на конкретный белок понятие включает "полно-размерный" непротессированный белок, а также любую форму белка, которая образуется в результате процессинга в клетке. Понятие включает также встречающиеся в естественных условиях варианты белка, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в описании, связывается с эпитопом CD3, CD137 или CLDN6, консервативным для CD3, CD137 или CLDN6 из различных видов. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем изобретении, представляет собой триспецифическую антигенсвязывающую молекулу, т.е. молекулу, которая обладает способностью специфически связываться с тремя различными антигенами-обладает способностью связываться либо с одним CD3, либо с одним CD137, но не может связываться с обоими антигенами одновременно, и обладает способностью специфически связываться с CLDN6.

Клаудин-6 (CLDN6) и другие белки семейства клаудинов.

В контексте настоящего описания понятие "CLDN6" относится к любому нативному клаудину-6 из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Аминокислотная последовательность человеческого CLDN6 (hCLDN6) представлена в SEQ ID NO: 196 или 197, а аминокислотная последовательность мышинного CLDN6 (mCLDN6) представлена в SEQ ID NO: 201.

В семейство клаудинов входит большое количество других белков, отличных от CLDN6, таких как CLDN3, CLDN4 и CLDN9. Аминокислотные последовательности человеческого CLDN3 (hCLDN3), человеческого CLDN4 (hCLDN4) и человеческого CLDN9 (hCLDN9) представлены в SEQ ID NO: 199, 200 и 198 соответственно. Аминокислотные последовательности мышинного CLDN3 (mCLDN3), мышинного CLDN4 (mCLDN4) и мышинного CLDN9 (mCLDN9) представлены в SEQ ID NO: 203, 204 и 202 соответственно.

CD3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула специфически связывается с полным пептидом или с частью неполного пептида CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 обезьян циномогус, более конкретно человеческий CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает перекрестной реактивностью (т.е. специфически связывается с) CD3 человека и обезьян циномогус. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться с эпсилон-субъединицей CD3, в частности, эпсилон-субъединицей человеческого CD3, которая представлена в SEQ ID NO: 170 (NP_000724.1) (в скобках представлены регистрационные номера RefSeq). В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая

молекула обладает способностью специфически связываться с эpsilon-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула связывается с эpsilon-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности Т-клеток.

CD137.

В конкретных вариантах осуществления изобретения CD137 представляет собой человеческий CD137. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, содержат антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп человеческого CD137, с которым связывается антитело, выбранное из группы, которая состоит из:

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность

SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS

MCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO:182),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность

DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 181),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC

SSTSNAEC (SEQ ID NO: 183), и

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC (SEQ ID NO: 180) в человеческом белке CD137.

Антигенсвязывающий домен.

Понятие "антигенсвязывающий домен" относится к участку антитела, который содержит область, специфически связывающуюся и комплементарную участку антигена или всему антигену. Антигенсвязывающий домен может быть представлен одним или несколькими вариabельными доменами антитела (которые называют также вариabельными областями). Предпочтительно антигенсвязывающие домены содержат и вариabельную область легкой цепи антитела (VL), и вариabельную область тяжелой цепи антитела (VH). Указанные предпочтительные антигенсвязывающие домены включают, например, "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv2 (scFv2)", "Fab" и "F(ab')₂". Антигенсвязывающий домен может также состоять из однодоменных антител.

Однодоменное антитело.

В настоящем описании понятие "однодоменное антитело" не ограничено конкретной структурой, если домен сам может проявлять антигенсвязывающую активность. Известно, что каноническое антитело, примером которого является антитело IgG-типа, проявляет антигенсвязывающую активность в состоянии, в котором вариabельная область формируется путем спаривания VH и VL, в то время как однодоменное антитело обладает способностью проявлять антигенсвязывающую активность посредством только его собственной доменной структуры без спаривания с другим доменом. Однодоменные антитела, как правило, имеют относительно низкую молекулярную массу и находятся в форме мономера.

Примеры однодоменного антитела включают (но не ограничиваясь только ими) антигенсвязывающие молекулы, в которых в естественных условиях отсутствуют легкие цепи, такие как V_{NAR} животных семейства верблюдовых (Camelidae) и V_{NAR} акул, и фрагменты антител, которые содержат цельный VH-домен антитела или его часть или цельный VL-домен антитела или его часть. Примеры однодоменного антитела, которое представляет собой фрагмент антитела, содержащий цельный VH/VL-домен или его часть, включают (но не ограничиваясь только ими) искусственно полученные однодоменные антитела, имеющие происхождение из VH человеческого антитела или VL человеческого антитела, которые описаны, например, в патенте США № 6248516 B1 и т.д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одно однодоменное антитело имеет три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3).

Однодоменные антитела можно получать из животного, которое обладает способностью продуцировать однодоменное антитело, или путем иммунизации животного, которое обладает способностью продуцировать однодоменное антитело. Примеры животных, которые обладают способностью продуцировать однодоменные антитела, включают (но не ограничиваясь только ими) животных семейства верблюдовых и трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело. К животным семейства верблюдовых относятся верблюды, ламы, альпаки, дромедары, гуанако и др. Примеры трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело, включают (но не ограничиваясь только ими) трансгенных животных, которые описаны в международной публикации WO 2015/143414 или публикации патента США 2011/0123527 A1. Гуманизированные однодоменные антитела можно получать также путем замены последовательностей каркасных участков однодоменного антитела, полученных из животного, на последовательности человеческой зародышевой линии или сходные последовательности. Гуманизированное однодоменное антитело (например, гуманизированное V_{NH}) является одним из вариантов однодоменного антитела, предлагаемого в настоящем изобретении.

Альтернативно этому, однодоменные антитела можно получать из полипептидных библиотек, содержащих однодоменные антитела, с помощью ELISA, пэннинга или т.п. Примеры полипептидных библиотек, содержащих однодоменные антитела, включают (но не ограничиваясь только ими) библиотеки наивных антител, полученные из различных животных или людей (см., например, *Methods in Molecular Biology* 911, 2012, сс. 65-78 и *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764, 8, 2006, сс. 1307-1319), библиотеки антител, полученных путем иммунизации различных животных (см., например, *Journal of Applied Microbiology* 117, 2, 2014, сс. 528-536), и библиотеки синтетических антител, полученных из генов антител различных животных или людей (см., например, *Journal of Biomolecular Screening* 21,1, 2016, сс. 35-43, *Journal of Biological Chemistry* 291, 24, 2016, сс. 12641-12657) и *AIDS* 30, 11, 2016, сс. 691-1701).

Вариабельная область.

В контексте настоящего описания понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628).

HVR или CDR.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными ("определяющие комплементарность участки" или "CDR") и/или формируют петли определенной структуры ("гипервариабельные петли"), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки ("контакты с антигеном"). Гипервариабельные участки (HVR) обозначают также как "определяющие комплементарность участки" (CDR), и эти понятия в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо со ссылкой на положения вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие участки. Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3).

Примеры HVR включают:

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., *J. Mol. Biol.* 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др., выше. HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 обозначают также как "H-CDR1", "H-CDR2", "H-CDR3", "L-CDR1", "L-CDR2" и "L-CDR3" соответственно.

Способность связываться с CD3 и CD137.

Обладает ли вариабельная область антитела, представленная в настоящем изобретении, "способностью связываться с CD3 и CD137" можно определять с помощью метода, известного в данной области.

Для этой цели можно, например, применять метод электрохемилюминесценции (ECL-метод) (BMC Research Notes 4, 2011, с. 281).

В частности, например, для низкомолекулярного антитела, содержащего область, которая обладает способностью связываться с CD3 и CD137, например, Fab-область, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу, подлежащую тестированию, или одновалентное антитело (антитело, в котором отсутствует одна из двух Fab-областей, которые присутствуют в каноническом антителе), смешивают с CD3 или CD137, меченным сульфо-меткой (комплекс с Ru), и смесь добавляют на планшет с иммобилизованным стрептавидином. При осуществлении этой операции меченная биотином антигенсвязывающая молекула, подлежащая тестированию, связывается со стрептавидином на планшете. Свет испускается от сульфо-метки и люминесцентный сигнал можно обнаруживать с помощью устройства Sector Imager 600 или 2400 (фирма MSD K.K.) или т.п., подтверждающая тем самым связывание вышеуказанной области антигенсвязывающей молекулы, подлежащей тестированию, с CD3 или CD137.

Альтернативно этому, указанный анализ можно проводить с помощью ELISA, FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией), ALPHA Screen (скрининг на основе гомогенного анализа уси-

ленной за счет эффекта близости люминесценции), метода BIACORE, основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и т.д. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 2006, сс. 4005-4010).

В частности, анализ можно проводить с использованием, например, анализатора взаимодействия Biacore (фирма GE Healthcare Japan Corp.) на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализатор Biacore включает любую модель, такую как Biacore T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000 или С. Любой сенсорный чип для Biacore, такой как чип CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA, LI, HPA или Au, можно применять в качестве сенсорного чипа. Белки для захвата антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, такие как белок А, белок G, белок L, антитела к человеческому IgG, антитела к человеческому IgG-Fab, антитела к человеческой L-цепи, антитела к человеческой Fc, антигенные белки или антигенные пептиды, иммобилизуют на сенсорном чипе с помощью метода сочетания, такого как аминное сочетание, дисульфидное сочетание или альдегидное сочетание. CD3 или CD137 инъецируют на чип в качестве аналита и измеряют взаимодействие с получением сенсограммы. При осуществлении этой операции концентрацию CD3 или CD137 можно выбирать в диапазоне от нескольких мкМ до нескольких пМ в зависимости от силы взаимодействия (например, KD) анализируемого образца.

Альтернативно этому, на сенсорном чипе можно иммобилизовывать CD3 или CD137 вместо антигенсвязывающей молекулы, с которым образцу антитела, подлежащего тестированию, в свою очередь дают взаимодействовать. Обладает ли переменная область антитела антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, связывающей активностью в отношении CD3 или CD137, можно определять на основе величины константы диссоциации (KD), рассчитанной из сенсограммы, характеризующей взаимодействие, или на основе увеличения уровня на сенсограмме, характеризующей взаимодействие, после воздействия образца антигенсвязывающей молекулы по сравнению с уровнем до воздействия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активность или аффинность связывания переменной области антитела, представленного в настоящем описании, с представляющим интерес антигеном (т.е. CD3 или CD137) оценивают при 37°C (для CD137) или 25°C (для CD3) с использованием устройства Biacore T200 (фирма GE Healthcare) или устройства Biacore 8K (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc (например, фирмы GE Healthcare) иммобилизуют на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа с использованием набора для аминного сочетания (например, фирмы GE Healthcare). Антигенсвязывающие молекулы или переменные области антитела захватывают на сенсорных поверхностях, покрытых антителом к Fc, затем на проточную ячейку инъецируют антиген (CD3 или CD137). Уровни захвата антигенсвязывающих молекул или переменных областей антитела могут соответствовать 200 резонансным единицам (RU). Рекомбинантный человеческий CD3 или CD137 можно инъецировать в концентрации 2000-125нМ, полученной путем двукратного серийного разведения, после чего оценивать диссоциацию. Все антигенсвязывающие молекулы или переменные области антитела и аналиты готовят в ACES-буфере, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% Na₃N. Сенсорную поверхность регенерируют после каждого цикла с помощью 3М MgCl₂. Аффинность связывания определяют путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1с помощью, например, программного обеспечения Biacore Insight Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare) или программного обеспечения Biacore 8K Evaluation (фирма GE Healthcare). Величины KD рассчитывают для оценки специфической активности или аффинности связывания антигенсвязывающих доменов, представленных в настоящем описании.

ALPHAScreen-анализ (скрининг на основе ALPHA) осуществляют с помощью технологии ALPHA, в которой используют два типа гранул (донор и акцептор) на основе следующего принципа: люминесцентные сигналы поддаются обнаружению только тогда, когда указанные две гранулы находятся в непосредственной близости благодаря биологическому взаимодействию между молекулой, связанной с гранулой-донором, и молекулой, связанной с гранулой-акцептором. Возбужденные лазерным пучком фотосенсибилизаторы в грануле-доноре превращают кислород окружающей среды в возбужденный синглетный кислород. Когда молекулы синглетного кислорода распространяются от гранулы-донора и достигают гранулы-акцептора, расположенной в непосредственной близости к ней, то индуцируется хемилуминесцентная реакция в грануле, что в результате приводит к испусканию света. В отсутствие взаимодействия между молекулой, связанной с гранулой-донором, и молекулой, связанной с гранулой-акцептором, синглетный кислород, который продуцируется гранулой-донором, не достигает гранулы-акцептора. В результате хемилуминесцентная реакция не происходит.

Одну из субстанций (лиганд), предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют на тонкой золотой пленке сенсорного чипа. Сенсорный чип освещают светом с задней поверхности таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом. В результате этого в части отраженного света формируется область с пониженной интенсивностью отражения (SPR-сигнал). Другую субстанцию (аналит), предназначенную для исследования взаимодействия, пропускают по поверхности сенсорного чипа. Когда аналит связывается с лигандом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает, что приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Указанное изменение показателя преломления приводит к тому, что положение SPR-сигнала сдвигается (в противоположность этому, положение сигнала воз-

вращается в исходное положение, если происходит диссоциация связанных молекул). С помощью Biacore-системы строят график, откладывая по оси ординат величину сдвига, т.е. изменение массы на поверхности сенсорного чипа, и таким образом получают в качестве результатов анализа зависимость изменения массы от времени (сенсограмму). На сенсограмме можно определять количество аналита, связанного с лигандом, захваченным на поверхности сенсорного чипа (уровень изменения ответа на сенсограмме до и после взаимодействия с аналитом). Однако, поскольку связанное количество зависит также от количества лиганда, то сравнение следует осуществлять в условиях, в которых используют практически одинаковые количества лиганда. Кинетические параметры, т.е. константу скорости ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d), можно определять из представленных в виде кривых сенсограмм, и рассчитывать константу диссоциации (KD) как отношение двух указанных констант. Для анализа ингибирования также предпочтительно применяют BIACORE-метод. Примеры анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

Отсутствие способности связываться с CD3 и CD137 одновременно Понятие "не связывается с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно" или "не может связываться с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно" означает, что антигенсвязывающий фрагмент ли вариабельная область антитела, представленный/представленная в настоящем описании, не может связываться с CD137 в состоянии, когда она связана с CD3, и антигенсвязывающий фрагмент или вариабельная область антитела не может связываться с CD3 в состоянии, когда она связана с CD137. В этом контексте фраза "не связывается с CD3 и CD137 одновременно" включает отсутствие перекрестного связывания клетки, экспрессирующей CD3, с клеткой, экспрессирующей CD137, или отсутствие одновременного связывания с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется на различных клетках. Указанная фраза включает также случай, при котором вариабельная область обладает способностью связываться с обоими CD3 и CD137 одновременно, когда CD3 и CD137 не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае с растворимыми белками, или когда они оба находятся в одной и той же клетке, но не может одновременно связываться с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется в разных клетках. Указанная вариабельная область антитела не ограничена конкретной областью, если вариабельная область антитела обладает указанными функциями. Их примеры включают вариабельные области, полученные из вариабельной области антитела IgG-типа путем изменения части ее аминокислот таким образом, чтобы они связывались с требуемым антигеном. Подлежащую изменению аминокислоту выбирают, например, из аминокислот, изменение которых не отменяет связывание с антигеном в вариабельной области антитела, которая связывается с CD3 или CD137.

В этом контексте фраза "экспрессируется на различных клетках" означает только то, что антигены экспрессируются на отличных друг от друга клетках. Комбинация таких клеток может представлять собой, например, одни и те же типы клеток, такие как Т-клетка и другая Т-клетка, или может представлять собой различные типы клеток, такие как Т-клетка и НК-клетка.

Тот факт, что антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, "не связывается с CD3 и CD137 одновременно" можно подтверждать следующим образом: устанавливают, что антигенсвязывающая молекула обладает связывающей активностью в отношении и CD3, и CD137; затем дают либо CD3, либо CD137 связываться заранее с антигенсвязывающей молекулой, которая содержит вариабельную область, обладающую указанной связывающей активностью; а затем с помощью указанного выше метода определяют присутствие или отсутствие ее связывающей активности в отношении другого антигена. Альтернативно этому, указанный факт можно подтверждать также, определяя, ингибируется ли связывание антигенсвязывающей молекулы либо с CD3, либо с CD137, иммобилизованным на ELISA-планшете или сенсорном чипе, после добавления в раствор другого антигена. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, либо с CD3, либо с CD137 ингибируется при связывании антигенсвязывающей молекулы с другим антигеном по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

Согласно одному из объектов изобретения, когда осуществляют иммобилизацию одного антигена (например, CD3), то ингибирование связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определять в присутствии другого антигена (например, CD137) с помощью методов, известных в данной области (т.е. ELISA, BIACORE и др.). Согласно другому объекту изобретения, когда осуществляют иммобилизацию CD137, то ингибирование связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 можно определять в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух указанных выше объектов изобретения считается, что антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, не связывается одновременно с CD3 и CD137, если связывание ингибируется по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация антигена, инъецируемого в качестве аналита, по меньшей мере в 1, 2, 5, 10, 30, 50 или 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации.

В предпочтительном варианте концентрация антигена, инъецируемого в качестве анализата, в 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации, и связывание ингибируется по меньшей мере на 80%.

В одном из вариантов осуществления изобретения рассчитывают отношение величины KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналита) к величине KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и для осуществления указанного выше анализа в условиях конкуренции можно использовать концентрацию CD3 (аналита), которая в зависимости от величины отношения KD ($KD(CD3)/KD(CD137)$) в 10, 50, 100 или 200 раз выше концентрации CD137 (иммобилизованного) (например, можно выбирать в 1, 5, 10 или 20 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 0,1. Кроме того, можно выбирать в 100, 500, 1000 или 2000 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 10).

Согласно одному из объектов изобретения, когда осуществляют иммобилизацию одного антигена (например, CD3), то ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определять в присутствии другого антигена (например, CD137) с помощью методов, известных в данной области (т.е. ELISA, ECL и т.д.). Согласно другому объекту изобретения, когда осуществляют иммобилизацию CD137, то ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 также можно определять в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух указанных выше объектов изобретения, считается, что антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, не связывается одновременно с CD3 и CD137, если характеризующий связывание сигнал ослабевает по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация антигена, инъецируемого в качестве анализата, по меньшей мере в 1, 2, 5, 10, 30, 50 или 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации.

В предпочтительном варианте концентрация антигена, инъецируемого в качестве анализата, в 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации, и связывание ингибируется по меньшей мере на 80%.

В одном из вариантов осуществления изобретения рассчитывают отношение величины KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналита) к величине KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 (иммобилизованного) ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и для осуществления указанного выше анализа в условиях конкуренции можно использовать концентрацию CD3 (аналита), которая в зависимости от величины отношения KD ($KD(CD3)/KD(CD137)$) в 10, 50, 100 или 200 раз выше концентрации CD137 (иммобилизованного) (например, можно выбирать в 1, 5, 10 или 20 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 0,1. Кроме того, можно выбирать в 100, 500, 1000 или 2000 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 10).

В частности, в случае применения, например, ECL-метода, приготавливают меченую биотином подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу, CD3, меченный сульфо-меткой (комплекс с Ru), и немеченый CD137. Если подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не связывается одновременно с CD3 и CD137, то люминесцентный сигнал сульфо-метки обнаруживается в отсутствие немеченого CD137 при добавлении смеси подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы и меченого CD3 на планшет с иммобилизованным стрептавидином с последующим испусканием света. В противоположность этому, люминесцентный сигнал уменьшается в присутствии немеченого CD137. Указанное уменьшение люминесцентного сигнала можно оценивать количественно, определяя относительную связывающую активность. Указанный анализ можно аналогично осуществлять с использованием меченого CD137 и немеченого CD3.

В случае применения метода ALPHA Screen подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствие конкурирующего CD137 с образованием сигналов с длиной волны от 520 до 620 нм. Немеченый CD137 конкурирует с CD3 за взаимодействие с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой. Уменьшение флуоресценции, являющееся результатом конкуренции, можно оценивать количественно, определяя тем самым относительную связывающую активность. Биотинилирование полипептидов с использованием сульфо-NHS-биотина или т.п. известно в данной области. CD3 можно метить с помощью GST с использованием соответствующим образом адаптированного метода, который включает, например: слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение возможности полученному в результате слитому гену экспрессироваться клетками или т.п., несущими векторы, которые могут экспрессироваться в них, с последующей очисткой с использованием колонки с глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют, например, с помощью программного обеспечения GRAPH PAD PRISM (фирма GraphPad Software, Inc., Сан-Диего), адаптированного к односайтовой модели конкуренции, на основе нелинейного регрессионного анализа. Указанный анализ можно аналогично осуществлять с ис-

пользованием меченого CD137 и немеченого CD3.

Альтернативно этому, можно применять метод на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). FRET представляет собой явление, при котором энергия возбуждения переносится посредством электронного резонанса непосредственно между двумя флуоресцентными молекулами, локализованными вблизи друг от друга. Когда FRET имеет место, то энергия возбуждения донора (флуоресцентная молекула, находящаяся в возбужденном состоянии) переносится на акцептор (другая флуоресцентная молекула, локализованная вблизи донора), в результате флуоресценция, испускаемая донором, исчезает (если быть точным, то укорачивается продолжительность флуоресценции), и вместо этого флуоресценция испускается акцептором. С помощью указанного явления можно анализировать, происходит или не происходит одновременное связывание с CD3 и CD137. Например, когда CD3, несущий донор флуоресценции, и CD137, несущий акцептор флуоресценции, одновременно связываются с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой, то флуоресценция донора исчезает, в то время как флуоресценция испускается акцептором. При этом происходит изменение длины волны флуоресценции. Это подтверждает, что указанное антитело связывается одновременно с CD3 и CD137. С другой стороны, если смесь CD3, CD137 и подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы не изменяет длину волны флуоресценции флуоресцентного донора, связанного с CD3, то указанная подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула может рассматриваться как содержащая антигенсвязывающий домен, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно.

Например, меченной биотином подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекуле дают связываться со стрептавидином на грануле-доноре, а CD3, меченному глутатион-S-трансферазой (GST), дают связываться с гранулой-акцептором. Подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствие конкурирующего второго антигена, генерируя сигналы с длиной волны от 520 до 620 нм. Немеченый второй антиген конкурирует с CD3 за взаимодействие с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой. Уменьшение флуоресценции, являющееся результатом конкуренции, можно оценивать количественно, определяя тем самым относительную связывающую активность. Биотинилирование полипептидов с использованием сульфо-NHS-биотина или т.п. известно в данной области. CD3 можно метить с помощью GST с использованием соответствующим образом адаптированного метода, который включает, например: слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение возможности полученному в результате слитому гену экспрессироваться клетками или т.п., несущими векторы, которые могут экспрессироваться в них, с последующей очисткой с использованием колонки с глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют, например, с помощью программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad Software, Inc., Сан-Диего), адаптированного к односайтовой модели конкуренции, на основе нелинейного регрессионного анализа.

Мечение не ограничено мечением с помощью GST и его можно осуществлять с использованием любой метки, включая (но не ограничиваясь только ими) гистициновую метку, MBP, CBP, Flag-метку, HA-метку, V5-метку или с-тус-метку. Связывание подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы с гранулой-донором не ограничено связыванием на основе реакции биотин-стрептавидин. В частности, когда подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула содержит Fc, то пригодный метод включает обеспечение возможности подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекуле связываться через распознающий Fc белок, такой как белок A или белок G, на грануле-доноре.

Кроме того, случай, в котором переменная область обладает способностью одновременно связываться с CD3 и CD137, когда CD3 и CD137 не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае растворимых белков, или они оба присутствуют в одной и той же клетке, но не могут одновременно связываться с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется на различных клетках, можно оценивать также с помощью метода, известного в данной области.

В частности, подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу, для которой подтверждена с помощью ECL-ELISA способность одновременно связываться с CD3 и CD137, смешивают также с клеткой, которая экспрессирует CD3, и клеткой, которая экспрессирует CD137. Можно продемонстрировать, что подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула не способна связываться одновременно с CD3 и CD137, которые экспрессируются на разных клетках, если антигенсвязывающая молекула и указанные клетки не связываются одновременно друг с другом. Указанный анализ можно проводить, например, с помощью клеточного ECL-ELISA. Клетку, экспрессирующую CD3, предварительно иммобилизуют на планшете. После связывания с ней подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы в планшет добавляют клетку, экспрессирующую CD137. Другой антиген, который экспрессируется только на клетке, экспрессирующей CD137, выявляют с помощью меченого сульфо-меткой антитела к этому антигену. Сигнал появляется, когда антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с двумя антигенами соответственно, которые экспрессируются на двух клетках. Сигнал не появляется, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

В альтернативном варианте указанный анализ можно осуществлять с помощью ALPHA Screen-метода. Подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу смешивают с клеткой, которая экс-

прессирует CD3, связанный с гранулой-донором, и клеткой, которая экспрессирует CD137, связанный с гранулой-акцептором. Сигнал появляется, когда антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с двумя антигенами, которые экспрессируются соответственно на двух клетках. Сигнал не появляется, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

В альтернативном варианте указанный анализ можно осуществлять методом оценки взаимодействия с помощью системы Octet. Сначала клетке, которая экспрессирует CD3, меченный пептидной меткой, дают связываться с биосенсором, который распознает пептидную метку. Клетку, которая экспрессирует CD137, и подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу помещают в лунки и анализируют взаимодействие. Большой сдвиг длины волны, вызванный связыванием с биосенсором подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы и клетки, которая экспрессирует CD137, имеет место, когда антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с двумя антигенами, которые экспрессируются на двух клетках соответственно. Небольшой сдвиг длины волны, вызванный связыванием с биосенсором только подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы, имеет место, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

Вместо указанных методов, основанных на оценке связывающей активности, можно осуществлять анализ, основанный на оценке биологической активности. Например, клетку, экспрессирующую CD3, и клетку, экспрессирующую CD137, смешивают с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой и культивируют. Два антигена, которые экспрессируются на двух клетках соответственно, совместно активируются с помощью подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы, когда антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с этими двумя антигенами. При этом можно определять изменение сигнала активации, например, повышение соответствующих уровней фосфорилирования в прямом направлении относительно антигенов. В альтернативном варианте результатом активации может являться производство цитокинов. При этом можно оценивать количество образовавшихся цитокинов, для решения вопроса о том, происходит или нет одновременное связывание с двумя клетками. В альтернативном варианте в результате активации индуцируется цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей CD137. В альтернативном варианте в результате активации индуцируется экспрессия репортерного гена с помощью промотора, который активируется в прямом направлении в пути трансдукции сигнала CD137 или CD3. При этом можно измерять цитотоксичность или уровень образовавшихся репортерных белков, для решения вопроса о том, происходит или нет одновременное связывание с двумя клетками.

Молекула Fab.

Понятие "молекула Fab" относится к белку, состоящему из VH и CH1-домена тяжелой цепи ("тяжелая цепь Fab") и VL и CL-домена легкой цепи ("легкая цепь Fab") иммуноглобулина.

Слитые.

Под понятием "слитые" подразумевают, что компоненты (например, молекула Fab и субъединица Fc-домена) сцеплены пептидными связями либо непосредственно, либо через один или несколько пептидных линкеров.

"Кроссовер"-Fab.

Под понятием молекула "Кроссовер"-Fab (которую обозначают также как "Crossfab") подразумевают молекулу Fab, в которой обменены либо переменные области, либо константные области тяжелой и легкой цепей Fab, т.е. молекула кроссовер-Fab содержит пептидную цепь, которая состоит из переменной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи, и пептидную цепь, которая состоит из переменной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи. Для ясности изложения в молекуле кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены, пептидную цепь, которая содержит константную область тяжелой цепи, в контексте настоящего описания обозначают как "тяжелая цепь" молекулы кроссовер-Fab. И наоборот, в молекуле кроссовер-Fab, в которой константные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены, пептидную цепь, которая содержит переменную область тяжелой цепи, в контексте настоящего описания обозначают как "тяжелая цепь" молекулы кроссовер-Fab.

"Канонический" Fab.

В отличие от этого, под молекулой "канонического" Fab подразумевают молекулу Fab в ее встречающемся в естественных условиях формате, т.е. содержащую тяжелую цепь, которая состоит из переменной и константной областей тяжелой цепи (VH-CH1), и легкую цепь, которая состоит из переменной и константной областей легкой цепи (VL-CL). Понятие "молекула иммуноглобулина" относится к белку, который имеет структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины IgG-класса представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, в направлении от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или varia-

белым доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), который называют также константой областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может принадлежать к одному из пяти типов, которые обозначают как альфа (IgA), дельта (IgD), эpsilon (IgE), гамма (IgG) или мю (IgM), некоторые из которых можно дополнительно подразделять на подтипы, например, гамма1 (IgG1), гамма2 (IgG2), гамма3 (IgG3), гамма4 (IgG4), альфа1 (IgA1) и альфа2 (IgA2). Легкая цепь иммуноглобулина может принадлежать к одному из двух типов, которые обозначают как каппа и лямбда на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин по существу состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые сцеплены через шарнирную область иммуноглобулина.

Аффинность.

Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, антигенсвязывающей молекулы или антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания, если не указано иное, "аффинность связывания" относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающей пары (например, антигенсвязывающей молекулой и антигеном или антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (KD), которая представляет собой отношение констант скоростей реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если отношение констант остается одинаковым. Аффинность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Конкретный метод измерения аффинности основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Методы определения аффинности.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула или антитело, представленная/представленное в настоящем описании, имеют константу диссоциации (KD), характеризующую связывание с антигеном, составляющую 1мкМ или менее, 120нМ или менее, 100нМ или менее, 80нМ или менее, 70нМ или менее, 50нМ или менее, 40нМ или менее, 30нМ или менее, 20нМ или менее, 10нМ или менее, 2нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее, 0,01нМ или менее или 0,001нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В конкретных вариантах осуществления изобретения величина KD, характеризующая связывание антитела/антигенсвязывающей молекулы с CD3, CD137 или CLDN6, находится в диапазоне 1-40, 1-50, 1-70, 1-80, 30-50, 30-70, 30-80, 40-70, 40-80 или 60-80нМ. В одном из вариантов осуществления величину KD измеряют с помощью анализа связывания несущего радиоактивную метку антигена (РИА). В одном из вариантов осуществления изобретения РИА осуществляют с использованием Fab-версии представляющего интерес антитела и его антигена. Например, измеряют в растворе аффинность связывания Fab с антигеном путем уравнивания Fab минимальной концентрацией 125 I-меченного антигена в присутствии полученных титрованием разведений немеченного антигена, осуществляя затем захват связанного антигена на сенсibilизированном антителом к Fab планшете (см., например, Chen и др., J. Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Для обеспечения условий, необходимых для проведения анализа, многоруночные планшеты MICROTITER® (фирма Thermo Scientific) сенсibilизируют в течение ночи захватывающим антителом к Fab (фирма Cappel Labs) в концентрации 5 мкг/мл в 50мМ карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют с помощью 2% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина в ЗФР в течение 2-5 ч при комнатной температуре (примерно 23°C). В неадсорбирующем планшете (фирма Nunc, № 269620) смешивают взятый в концентрации 100 или 26пМ меченный с помощью 125 I антиген с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, пригодного для оценки антитела к VEGF, Fab-12, см. Presta и др., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно осуществлять в течение более продолжительного периода времени (например, в течение примерно 65 ч) для того, чтобы гарантировать достижение равновесия. После этого смеси переносят в подготовленный для захвата планшет и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20®) в ЗФР. После просушки планшетов в них добавляют по 150 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости ((MICROSCINT-20®; фирма Packard) и осуществляют считывание планшетов с помощью гамма-счетчика TOPCOUNT (фирма Packard) в течение 10 мин. Для осуществления анализа связывания в условиях конкуренции выбирают концентрации каждого Fab, обеспечивающие уровень связывания, составляющий менее или равный 20% от максимального.

В другом варианте осуществления изобретения Kd измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью BIACORE®-анализа. Например, анализ осуществляют с помощью устройства BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (фирма GE Healthcare Inc., Пискалавей, шт. Нью-Джерси) при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на CM5-чипах с уровнем иммобилизации, соответствующим ~10 единицам ответа (RU). В одном из вариантов осуществления изобретения биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма BIACORE Inc.) активируют с помощью гидрoхлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидрокси-сукцинимид (NHS)

согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят 10мМ ацетатом натрия, рН 4,8 до концентрации 5 мкг/мл (~ 0,2мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения уровня иммобилизации, соответствующего примерно 10 единицам ответа (RU) сшитого белка. После инъекции антигена инъецируют 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецируют двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500нМ) в ЗФР, дополненном 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20®) в качестве поверхностно-активного вещества (ЗФРТ), при 25°С со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программное обеспечение Evaluation версия 3.2, BIACORE®) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Если скорость реакции ассоциации превышает $10^6 M^{-1} c^{-1}$ при оценке с помощью описанного выше метода поверхностного плазмонного резонанса, то скорость реакции ассоциации можно определять с помощью метода гашения флуоресценции, который позволяет измерять повышение или снижение интенсивности излучения флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм; длина волны испускания 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°С применяемого в концентрации 20нМ антитела к антигену (Fab-формат) в ЗФР, рН 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, осуществляя измерения с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр, снабженный блоком для остановки потока (фирма Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-AMINCO™ серии 8000 (фирма ThermoSpectronic), при перемешивании содержимого кюветы.

Используя описанные выше методы измерения аффинности антигенсвязывающей молекулы или антитела, описанной/описанного выше, специалисты в данной области могут осуществлять измерение аффинности других антигенсвязывающих молекул или антител в отношении различных типов антигенов.

Антитело.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле, и оно относится к различным структурам антител, включая (но не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Класс антитела.

Понятие "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

Если не указано иное, то аминокислотные остатки в константной области легкой цепи нумеруют согласно Kabat и др., а нумерация аминокислотных остатков в константной области тяжелой цепи соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Каркасный участок.

Понятие "каркасный участок" или "FR", обозначает остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Человеческий консенсусный каркасный участок.

"Человеческий консенсусный каркасный участок" представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., публикация NIH 91-3242, Bethesda MD, т.т. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

Химерное антитело.

Понятие "химерное" антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида. Аналогично этому, понятие "вариабельный домен химерного антитела" относится к вариабельной области антитела, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида.

Гуманизированное антитело.

Понятие "гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Понятие "гуманизированная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергли гуманизации. "Гуманизированная переменная область антитела" относится к переменной области гуманизированного антитела.

Человеческое антитело.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или в человеческой клетке, или имеющее происхождение из нечеловеческого источника, в котором использован спектр человеческих антител или другие кодирующие человеческое антитело последовательности. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. "Человеческая переменная область антитела" относится к переменной области человеческого антитела.

Полинуклеотид (нуклеиновая кислота).

Понятие "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", которое применяют взаимозаменяемо в контексте настоящего описания, относится к полимерам нуклеотидов любой длины и включает ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или с помощью реакции синтеза. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Последовательность нуклеотидов может прерываться компонентами, которые не представляют собой нуклеотиды. Полинуклеотид может содержать модификацию(и), осуществленную(ые) после синтеза, такую как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или нескольких встречающихся в естественных условиях нуклеотидов на аналоги, межнуклеотидные модификации, такие, например, как модификации, созданные с помощью незаряженных связей (например, метилфосфонаты, сложные фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.д.) и с помощью заряженных связей (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), модификации, содержащие "повешенные" остатки, такие, например, как белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), модификации, созданные с помощью интеркаляторов (например, акридин, псорален и т.д.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.д.), модификации, содержащие алкилаторы, модификации с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любую из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, можно заменять, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищать с помощью стандартных защитных групп или активировать для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или можно конъюгировать с твердыми или полутвердыми подложками. 5'- и 3'- концевую ОН-группу можно фосфорилировать или замещать аминами или фрагментами органических кэпирующих групп, состоящими из 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы можно также дериватизировать с получением стандартных защитных групп. Полинуклеотиды могут содержать также формы аналогов Сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые хорошо известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги Сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимеры сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные формы Сахаров, фуранозные формы Сахаров, седогептулозы, ациклические аналоги и основные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Указанные альтернативные связывающие группы включают (но не ограничиваясь только ими) варианты, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), в которых R или R' каждый независимо друг от друга обозначает H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий эфирную (-O)-связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не является необходимым, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Представленное выше описание относится ко всем полинуклеотидам, указанным в настоящем описании, включая РНК и ДНК.

Выделенная (нуклеиновая кислота).

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает также молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в

которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Вектор.

Понятие "вектор" в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как "экспрессионные векторы". Векторы можно интродуцировать в клетки-хозяева с использованием вируса или электропорации. Однако интродукция векторов не ограничена методом *in vitro*. Например, векторы можно интродуцировать также в организм непосредственно с помощью метода *in vivo*.

Клетка-хозяин.

Понятия "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, а может содержать мутации. Понятие включает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отбора у исходной трансформированной клетки.

Специфичность.

"Специфичность" означает, что молекула, которая связывается специфически с одним или несколькими партнерами по связыванию, не обладает каким-либо значительным связыванием с молекулами, отличными от партнеров. Кроме того, понятие "специфичность" используют также, когда антигенсвязывающий центр обладает специфичностью в отношении конкретного эпитопа из множества эпитопов, присутствующих в антигене. Если антигенсвязывающая молекула связывается специфически с антигеном, то ее обозначают также как "антигенсвязывающая молекула, которая обладает/характеризуется специфичностью к/в отношении антигена". Когда эпитоп, с которым связывается антигенсвязывающий центр, присутствует в нескольких различных антигенах, то антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий центр, может связываться с различными антигенами, имеющими эпитоп.

Фрагмент антитела.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) молекулы Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см. у Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см, например, у Pluckthun, в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore (изд-во Springer-Verlag, New York), 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение, касающееся Fab- и F(ab')₂-фрагментов, которые содержат остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладают удлинненным временем полужизни *in vivo*, см. в патенте США № 5869046. Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, сс. 129-134; и Holliger и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у Hudson и др., *Nat. Med.* 9, 2003, сс. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь варибельный домен тяжелой цепи или его часть, или весь варибельный домен легкой цепи антитела или его часть. В конкретных вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтхэм, шт. Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 B1). Фрагменты антител можно создавать различными методиками, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фаг), указанных в настоящем описании.

Варибельный фрагмент (Fv).

В контексте настоящего описания понятие "варибельный фрагмент (Fv)" относится к минимальному компоненту антигенсвязывающего центра, имеющему происхождение из антитела, который состоит из пары, включающей варибельную область легкой цепи антитела (VL) и варибельную область тяжелой цепи антитела (VH). В 1988 г. Skerra и Pluckthun обнаружили, что гомогенные и активные антитела можно получать из периплазматической фракции *E. coli* путем инсерции гена антитела в прямом направлении относительно бактериальной сигнальной последовательности и индукции экспрессии гена в *E. coli* (*Science* 240(4855), 1988, сс. 1038-1041). В Fv, полученном из периплазматической фракции, ассоциация VH с VL происходила таким образом, что имело место связывание с антигеном.

scFv, одноцепочечное антитело и sc(Fv)₂.

В контексте настоящего описания понятия "scFv", "одноцепочечное антитело" и "sc(Fv)₂" все относятся к фрагменту антитела, состоящему из одной полипептидной цепи, которая содержит переменные области, имеющие происхождение из тяжелой и легкой цепей, но не содержит константную область. В целом, одноцепочечное антитело содержит также полипептидный линкер между VH-и VL-доменами, который позволяет образовывать требуемую структуру, которая, как считается, должна обеспечивать связывание с антигеном. Подробности, касающиеся одноцепочечного антитела, обсуждены у Pluckthun в: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315 (см. также публикацию международной заявки на патент WO 1988/001649; патенты США №№ 4946778 и 5260203). В конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечное антитело может быть биспецифическим и/или гуманизированным.

scFv представляет собой одноцепочечное низкомолекулярное антитело, в котором VH и VL, образующие Fv, сцеплены друг с другом с помощью пептидного линкера (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(16), 1988, сс. 5879-5883). VH и VL могут удерживаться в непосредственной близости с помощью пептидного линкера.

sc(Fv)₂ представляет собой одноцепочечное антитело, в котором четыре переменные области двух VL и двух VH сцеплены с помощью линкеров, таких как пептидные линкеры, с образованием одной цепи (J Immunol. Methods 231(1-2), 1999, сс. 177-189). Две VH и две VL могут иметь происхождение из различных моноклональных антител. Указанная молекула sc(Fv)₂ предпочтительно включает, например, биспецифическую молекулу sc(Fv)₂, распознающую два эпитопа, которые присутствуют в одном антигене, что описано в Journal of Immunology 152(11), 1994, сс. 5368-5374. sc(Fv)₂ можно получать методами, известными специалистам в данной области. Например, sc(Fv)₂ можно получать путем сцепления scFv с помощью линкера, такого как пептидный линкер.

В контексте настоящего описания sc(Fv)₂ включает два VH-компонента и два VL-компонента, которые упорядочены следующим образом: VH, VL, VH и VL ([VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок расположения двух VH-компонентов и двух VL-компонентов не ограничен указанной выше формой, и они могут располагаться любым образом. Примеры порядка расположения проиллюстрированы ниже.

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL],
 [VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH],
 [VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL],
 [VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH],
 [VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH].

Молекулярная форма sc(Fv)₂ описана также подробно в WO 2006/132352.

На основе указанного описания специалисты в данной области легко могут получать молекулу sc(Fv)₂, требуемую для создания полипептидных комплексов, указанных в настоящем описании.

Кроме того, антигенсвязывающие молекулы или антитела, указанные в настоящем описании, можно конъюгировать с носителем-полимером, таким как ПЭГ, или органическим соединением, таким как противораковый агент. Альтернативно этому, в антигенсвязывающие молекулы или антитела предпочтительно встраивают дополнительную последовательность сахарной цепи так, чтобы сахарная цепь оказывала требуемое действие.

Линкеры, которые можно применять для соединения переменных областей антитела, представляют собой произвольные пептидные линкеры, которые можно интродуцировать посредством генетической инженерии, синтетические линкеры и линкеры, описанные, например, в Protein Engineering, 9(3), 1996, сс. 299-305. Однако в настоящем описании предпочтительными являются пептидные линкеры. Длина пептидных линкеров не ограничена конкретной длиной, и специалисты в данной области могут выбирать ее соответственно в зависимости от поставленной цели. Длина предпочтительно составляет пять аминокислот или более (без конкретного ограничения, верхний предел, как правило, составляет 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее) и наиболее предпочтительно 15 аминокислот. Когда sc(Fv)₂ содержит три пептидных линкера, то длина их всех может быть одинаковой или различной.

Например, указанные пептидные линкеры включают:

Ser,
 Gly-Ser,
 Gly-Gly-Ser,
 Ser-Gly-Gly,
 Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 171),
 Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 172),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 173),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 174),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 175),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 176),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 177),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 178),
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 173))_n и
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 174))_n,

где *n* обозначает целое число 1 или более. Длину или последовательности пептидных линкеров могут выбрать соответственно специалисты в данной области в зависимости от поставленной цели.

Синтетические линкеры (химические перекрестносшивающие агенты), как правило, применяют для перекрестного сшивания пептидов, и их примеры включают:

N-гидроксисукцинимид (NHS),
 дисукцинимидилсуберат (DSS),
 бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3),
 дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP),
 дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP),
 этиленгликольбис(сукцинимидилсукцинат) (EGS),
 этиленгликольбис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS),
 дисукцинимидилтарtrat (DST), дисульфосукцинимидилтарtrat (сульфо-DST),
 бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил] (BSOCOES) и
 бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES).
 Указанные перекрестносшивающие агенты поступают в продажу.

В целом, для соединения вместе четырех переменных областей антитела требуются три линкера. Применяемые линкеры могут быть одного типа или разных типов.

Fab, F(ab')₂ и Fab'.

"Fab" состоит из одной легкой цепи и CH1-домена и переменной области из одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

"F(ab')₂" или "Fab" получают обработкой иммуноглобулина (моноклонального антитела) протеазой, такой как пепсин и папаин, и понятие относится к фрагменту антитела, созданному путем расщепления иммуноглобулина (моноклонального антитела) вблизи дисульфидных связей, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей. Например, папаин расщепляет IgG в обратном направлении относительно дисульфидных связей, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей, с образованием двух гомологичных фрагментов антител, в которых L-цепь, содержащая VL (переменную область L-цепи) и CL (константную область L-цепи), сцеплена с фрагментом H-цепи, содержащим VH (переменную область H-цепи) и CH-гамма 1 (участок гамма 1 в константной области H-цепи) через дисульфидную связь в их C-концевых областях. Каждый из указанных двух гомологичных фрагментов антитела обозначают как Fab'.

"F(ab')₂" состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, содержащих константную область CH1-домена и часть CH2-доменов, в результате чего между двумя тяжелыми цепями образуются дисульфидные связи. F(ab')₂, указанный в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим методом. Целое моноклональное антитело или подобную молекулу, содержащую требуемый антигенсвязывающий центр, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин; и Fc-фрагменты удаляют путем адсорбции на колонке с белком А. Протеаза не ограничена конкретной протеазой, если она обладает способностью расщеплять целое антитело избирательным образом с образованием F(ab')₂ в соответствующих требуемых условиях ферментативной реакции, таких как pH. Указанные протеазы включают, например, пепсин и фицин.

Fc-область.

Понятие "Fc-область" или "Fc-домен" относится к области, которая содержит фрагмент, состоящий из шарнирной области или ее части и СН₂- и СН₃-доменов молекулы антитела. Fc-область IgG-класса означает (но не ограничиваясь только ею) область, простирающуюся, например, от цистеина 226 (EU-нумерация (которую обозначают в настоящем описании как EU-индекс) до С-конца, или пролина 230 (EU-нумерация) до С-конца. Fc-область предпочтительно можно получать путем частичного расщепления, например, моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, с помощью протеолитического фермента, такого как пепсин, с последующим повторным элюированием фракции, адсорбированной на колонке с белком А или колонке с белком G. Указанный протеолитический фермент не ограничен конкретным ферментом, если он обладает способностью расщеплять цельное антитело до укороченной формы Fab или F(ab')₂ при соответствующих заданных условиях реакции для фермента (например, pH). Их примеры включают пепсин и папаин.

Fc-область, полученную, например, из встречающегося в естественных условиях IgG, можно применять в качестве "Fc-области", представленной в настоящем описании. В этом контексте встречающийся в естественных условиях IgG означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности IgG, встречающегося в природе, и принадлежит к классу антитела, который практически кодируется геном иммуноглобулина гамма. Встречающийся в естественных условиях человеческий IgG означает, например, встречающийся в естественных условиях человеческий IgG1, встречающийся в естественных условиях человеческий IgG2, встречающийся в естественных условиях человеческий IgG3 или встречающийся в естественных условиях человеческий IgG4. Встречающийся в естественных условиях человеческий IgG включает также варианты или т.п., спонтанно образовавшиеся из него. В Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242 описано множество последовательностей аллотипов, основанных на полиморфизме генов, в качестве константных областей антител, таких как человеческий IgG1, человеческий IgG2, человеческий IgG3 и человеческий IgG4, любые из которых можно применять в настоящем изобретении. В частности, в случае человеческого IgG1 аминокислотная последовательность в положениях 356-358 (EU-нумерация) может представлять собой DEL или EEM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит СН₂ и СН₃ константных доменов IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из указанных в настоящем описании вариантов осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

Одним из объектов изобретения, представленных в настоящем описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1, где Fc-домен состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

Одним из объектов изобретения, представленных в настоящем описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1, где Fc-домен содержит варианты, указанные ниже в п. (д1) или (д2):

(д1) первую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(д2) первую субъединицу Fc-области, содержащую Glu в положении 439, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Lys в положении 356; где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

Одним из объектов изобретения, представленных в настоящем описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1, где первая и/или вторая субъединица Fc-области, содержащаяся в Fc-домене, содержит(ат) вариант, указанный ниже в п. (е1) или п. (е2):

(е1) Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

(e2) Ala в положении 234, Ala в положении 235 и Ala в положении 297; где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

Одним из объектов изобретения, представленных в настоящем описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1,

где Fc-домен обладает дополнительно более сильной аффинностью связывания с человеческим FcRn по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

Одним из объектов изобретения, представленных в настоящем описании, является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит

(III) Fc-домен, который обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1,

где первая и/или вторая субъединица Fc-области, содержащаяся в Fc-домене, содержит(ат) Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440,

где аминокислотные положения пронумерованы согласно EU-индексу.

Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-рецептора (Fc-гамма рецептора).

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, обладает пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом IgG1. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен (или мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) обладает аффинностью связывания с Fc-рецептором, составляющей менее чем 50%, предпочтительно менее чем 20%, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от аффинности нативного Fc-домена IgG1 (или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей нативный Fc-домен). В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен (или мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) практически не связывается с Fc-рецептором. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc-гамма рецептор, более конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa, Fc-гамма RI или Fc-гамма RIIa, наиболее предпочтительно человеческий Fc-гамма RIIIa.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. Как правило, в каждой из двух субъединиц Fc-домена присутствует(ют) одинаковая(е) одна или несколько аминокислотных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В вариантах осуществления изобретения, в которых присутствует более одной аминокислотной мутации, снижающей аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или даже по меньшей мере в 50 раз. В одном из таких вариантов осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая сконструированный Fc-домен, обладает аффинностью связывания с Fc-рецептором, составляющей менее чем 20%, предпочтительно менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей несконструированный Fc-домен. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc-гамма рецептор, более конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa, Fc-гамма RI или Fc-гамма RIIa, наиболее предпочтительно человеческий Fc-гамма RIIIa. Предпочтительно снижают связывание с каждым из указанных рецепторов.

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, которая состоит из E233, L234, L235, N297, P331 и P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, которая состоит из L234, L235 и P329. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, прежде всего Fc-домен человеческого IgG1. В

одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, прежде всего P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329 и еще одну аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235. В более конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G ("P329G LALA"). В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, прежде всего Fc-домен человеческого IgG1. Комбинация аминокислотных замен "P329G LALA" практически полностью устраняет связывание Fc-домена человеческого IgG1 с Fc-гамма рецептором (а также с комплементом), что описано в публикации PCT WO 2012/130831. В WO 2012/130831 описаны также методы получения таких мутантных Fc-доменов и методы определения их свойств, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции.

Антитела IgG4-класса характеризуются сниженной аффинностью связывания с Fc-рецепторами и сниженными эффекторными функциями по сравнению с антителами IgG1-класса. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен активирующих Т-клетку биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, представляет собой Fc-домен IgG4, прежде всего Fc-домен человеческого IgG4. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG4 содержит аминокислотную замену в положении S228, конкретно аминокислотную замену S228P. В одном из вариантов осуществления изобретения для дополнительного снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции Fc-домен IgG4 содержит аминокислотную замену в положении L235, конкретно аминокислотную замену L235E. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG4 содержит аминокислотную замену в положении P329, конкретно аминокислотную замену P329G. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG4 содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, конкретно аминокислотные замены S228P, L235E и P329G. Такие мутанты Fc-домена IgG4 и их характеристики связывания с Fc-гамма рецептором описаны в публикации PCT WO 2012/130831.

В конкретных вариантах осуществления изобретения устраняют N-гликозилирование Fc-домена. В одном из таких вариантов Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении N297, прежде всего аминокислотную замену аспарагина на аланин (N297A) или аспарагиновую кислоту (N297D).

В конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретения Fc-домен, обладающий сниженной аффинностью связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом IgG1, представляет собой человеческий Fc-домен IgG1, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и N297A.

Мутантные Fc-домены можно получать путем аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации с помощью генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез гена и т.п. Правильность нуклеотидных изменений можно верифицировать, например, путем секвенирования.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство VIAcore (фирма GE Healthcare), а сами Fc-рецепторы можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Пригодные для этой цели анализы связывания представлены в настоящем описании. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или содержащих Fc-домен активирующих биспецифических антигенсвязывающих молекул с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, в отношении которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, таких как человеческие NK-клетки, экспрессирующие Fc-гамма IIIa рецептор.

Fc-рецептор.

Понятие "Fc-рецептор" или "FcR" относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG-класса (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Рецепторы Fc-гамма RII включают Fc-гамма RIIA ("активирующий рецептор") и Fc-гамма RIIВ ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся прежде всего их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc-гамма RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующие мотивы на основе тирозина иммунорецептора (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc-гамма RIIВ содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив на основе рецептора тирозина иммунорецептора (ITIM) (см., например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15, 1997, сс. 203-234). Обзор сведений о FcR пред-

ставлен, например, у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, сс. 457-492; Capel и др., *Immunomethods* 4, 1994, сс. 25-34 и de Haas и др., *J. Lab. Clin. Med.* 126, 1995, сс. 330-341. Под понятие "FcR", указанное в настоящем описании, подпадают и другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем.

Понятие "Fc-рецептор" или "FcR" включает также неонатальный рецептор, FcRn, который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., *J. Immunol.* 117, 1976, с. 587 и Kim и др., *J. Immunol.* 24, 1994, с. 249) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward., *Immunol. Today* 18(12), 1997, сс.592-598; Ghetie и др., *Nature Biotechnology* 15(7), 1997, сс. 637-640; Hinton и др., *J. Biol. Chem.* 279(8), 2004, сс. 6213-6216; WO 2004/92219 (Hinton и др.).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и время полужизни в плазме человеческого FcRn, отличающегося высокой аффинностью связывания с полипептидами, можно оценивать, например, в трансгенных мышцах или в трансфектированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или в приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (на имя Presta) описаны варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, также у Shields и др., *J. Biol. Chem.* 9(2), 2001, сс. 6591-6604).

Fc-гамма рецептор.

Fc-гамма рецептор представляет собой рецептор, обладающий способностью связываться с Fc-доменом моноклональных антител изотипа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и включают всех членов, принадлежащих к семейству белков, кодируемых в основном генами Fc-гамма рецептора. У человека это семейство включает Fc-гамма RI (CD64), в том числе изоформы Fc-гамма RIa, Fc-гамма Rib и Fc-гамма RIc; Fc-гамма RII (CD32), в том числе изоформы Fc-гамма RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc-гамма IIb (в том числе Fc-гамма RIIb-1 и Fc-гамма RIIb-2), и Fc-гамма RIIC; и Fc-гамма RIII (CD16), в том числе изоформы Fc-гамма RIIIa (включая аллотипы V158 и F158), и Fc-гамма RIIIb (включая аллотипы Fc-гамма RIIIb-NA1 и Fc-гамма RIIIb-NA2), и любые человеческие Fc-гамма R, изоформы Fc-гамма R и их аллотипы, которые пока еще не открыты. Однако Fc-гамма рецептор не ограничен указанными примерами. Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только им) рецепторы, имеющие происхождение из организма человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc-гамма рецептор может иметь происхождение из любых организмов. Мышиный Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только им) Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32), Fc-гамма RIII (CD16) и Fc-гамма RIII-2 (CD 16-2), а также не открытые пока мышиные Fc-гамма рецепторы, изоформы Fc-гамма рецептора и их аллотипы. Указанные предпочтительные Fc-гамма рецепторы включают, например, человеческие Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RIIA (CD32), Fc-гамма RIIb (CD32), Fc-гамма RIIIA (CD16) и/или Fc-гамма RIIb (CD16). Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RI представлены в RefSeq под регистрационным номером NM_000566.3 и в RefSeq под регистрационным номером NP_000557.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIA представлены в RefSeq под регистрационным номером BC020823.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAN20823.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIb представлены в RefSeq под регистрационным номером BC146678.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAI46679.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIIA представлены в RefSeq под регистрационным номером BC033678.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAN33678.1 соответственно; и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIb представлены в RefSeq под регистрационным номером BC 128562.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAI28563.1 соответственно. Обладает ли Fc-гамма рецептор связывающей активностью в отношении Fc-домена моноклонального антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции), метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и других методов (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(11), 2006, сс. 4005-4010), в дополнение к описанным выше форматам FACS и ELISA.

При этом, понятие "Fc-лиганд" или "эффекторный лиганд" относится к молекуле и предпочтительно к полипептиду, которая/который связывается с Fc-доменом антитела, формируя комплекс Fc/Fc-лиганд. Молекула может иметь происхождение из любых организмов. Связывание Fc-лиганда с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций. Указанные Fc-лиганды включают (но не ограничиваясь только ими) Fc-рецепторы, Fc-гамма рецептор, Fc-альфа рецептор, Fc-бета рецептор, FcRn, C1q и C3, маннан-связывающий лектин, рецептор маннозы, белок A *Staphylococcus*, белок G *Staphylococcus* и вирусные Fc-гамма рецепторы. Fc-лиганды включают также гомологи Fc-рецептора (FcRH) (Davis и др., *Immunological Reviews* 190, 2002, сс. 123-136), которые относятся к семейству Fc-рецепторов, гомологичных Fc-гамма рецептору. Fc-лиганды включают также пока не идентифицированные молекулы, которые связываются с Fc.

Связывающая активность в отношении Fc-гамма рецептора.

Нарушенную связывающую активность Fc-домена с любым из следующих Fc-гамма рецепторов:

Fc-гамма RI, Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIБ, Fc-гамма RIIIA и/или Fc-гамма RIIВ можно оценивать с помощью описанных выше форматов FACS и ELISA, а также ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции) и метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010).

ALPHA-скрининг осуществляют с применением технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул, доноров и акцепторов. Люминесцентный сигнал поддается обнаружению только тогда, когда молекулы, связанные с гранулами-донорами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород, окружающий гранулу, в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует из гранул-доноров и достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то в гранулах индуцируется хемилюминесцентная реакция. Эта реакция в итоге приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, то хемилюминесцентная реакция не происходит, поскольку синглетный кислород, который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов. Например, осуществляют иммобилизацию меченой/меченого биотином антигенсвязывающей молекулы или антитела на гранулах-донорах и иммобилизацию Fc-рецептора, меченого глутатион-S-трансферазой (GST), на гранулах-акцепторах. В отсутствие антигенсвязывающей молекулы или антитела, содержащей/содержащего конкурирующий мутантный Fc-домен, Fc-гамма рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, индуцируя в результате сигналы с длиной волны 520-620 нм. Антигенсвязывающая молекула или антитело, которая/которое имеет немеченый мутантный Fc-домен, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, за связывание с Fc-гамма рецептором. Относительную аффинность связывания можно оценивать, определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции. Методы биотинилирования антигенсвязывающих молекул или антител, таких как указанные антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются хорошо известными. Пригодные методы добавления GST-метки к Fc-гамма рецептору включают методы, в которых используют слияние полипептидов, кодирующих Fc-гамма рецептор и GST в рамке считывания, экспрессию слитого гена с использованием клеток, в которые интродуцирован вектор, несущий ген, и последующую очистку с помощью содержащей глутатион колонки. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такого программного обеспечения, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций, предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют в качестве лиганда на тонком слое золота на сенсорном чипе. При освещении светом с задней поверхности сенсорного чипа таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонким слоем золота и стеклом, интенсивность отраженного света частично снижается в конкретной области (SPR-сигнал). Другую субстанцию, предназначенную для исследования взаимодействия, инъецируют в качестве анализа на поверхность сенсорного чипа. Когда лиганд связывается с анализом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает. Это приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменения показателя преломления приводят к сдвигу положения SPR-сигнала (и наоборот, положение сигнала возвращается в исходное, если происходит диссоциация указанного связывания). С помощью BIACORE®-системы уровень описанного выше сдвига (т.е. изменение массы в зависимости на поверхности чипа) откладывают по вертикальной оси, и таким образом получают изменение массы с течением времени в качестве выходных данных (в виде сенсограммы). Кинетические параметры (константа скорости реакции ассоциации (k_a) и константа скорости реакции диссоциации (k_d)), определяют из представленных в виде кривых сенсограмм, и определяют аффинность (KD) как отношение указанных констант. BIACORE®-метод предпочтительно применяют в качестве метода для анализа ингибирования. Примеры такого метода для анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

Получение и очистка мультиспецифических антигенсвязывающих молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы представляют собой выделенные мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, указанные в настоящем описании, содержат два различных антигенсвязывающих фрагмента (например, "первый антигенсвязывающий фрагмент" и "второй антигенсвязывающий фрагмент", слитые с одной или другой из двух субъединиц Fc-домена, в результате две субъединицы Fc-домена, как правило, содержатся в двух неидентичных полипептидных цепях. Рекombинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Таким образом, для повышения выхода и чистоты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул при их рекombинантном получении, целесообразно интродуцировать в Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы модифи-

кацию, способствующую ассоциации требуемых полипептидов.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, указанной в настоящем описании, содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайт наиболее обширного белок-белкового взаимодействия между двумя субъединицами Fc-домена человеческого IgG находится в СН3-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в СН3-домене Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой так называемую модификацию "knob-into-hole", включающую модификацию, приводящую к образованию "выступа", в одной из двух субъединиц Fc-домена, и модификацию, приводящую к образованию "впадины", в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

Технология "knob-into-holes" (взаимодействие по типу "выступ-во-впадину") описана, например, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс.7-15. Как правило, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на границу раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") в границе раздела второго полипептида, так, чтобы выпуклость могла помещаться в полость, способствуя образованию гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости создают путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). Компенсаторные полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают на границе раздела второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланин или треонин).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения в СН3-домене первой субъединицы Fc-домена мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость на СН3-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СН3-домене второй субъединицы, и в СН3-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в СН3-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость на СН3-домене первой субъединицы.

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или пептидного синтеза.

В конкретном варианте осуществления изобретения в СН3-домене первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток триптофана (Т366W), а в СН3-домене второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменяют на остаток валина (Y407V). В одном из вариантов осуществления изобретения во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток серина (Т366S) и остаток лейцина в положении 368 заменяют на остаток аланина (L368A).

Еще в одном варианте осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменяют на остаток цистеина (S354C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменяют на остаток цистеина (Y349C). Интродукция указанных двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В других вариантах осуществления изобретения к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, представленным в настоящем описании, можно применять другие методики, способствующие ассоциации Н-цепей и L- и Н-цепей, имеющих требуемые комбинации.

Например, методики подавления нежелательной ассоциации Н-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на границу раздела второго константного участка или третьего константного участка Н-цепи антитела (СН2 или СН3) можно применять для ассоциации в мультиспецифическом антителе (WO 2006/106905).

При осуществлении методики подавления нежелательной ассоциации Н-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на границу раздела СН2 или СН3 примеры аминокислотных остатков, которые контактируют на границе раздела другого константного участка Н-цепи, включают области, соответствующие остаткам в положениях 356, 439, 357, 370, 399 и 409 в СН3-участке согласно EU-нумерации.

Более конкретно, примеры включают антитело, которое содержит два типа СН3-участков Н-цепи, в которых одна-три пары аминокислотных остатков в СН3-участке первой Н-цепи, выбранных из пар аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (1)-(3), несут один и тот же тип заряда: (1) аминокислотные остатки, содержащиеся в СН3-участке Н-цепи в положениях 356 и 439 согласно EU-нумерации; (2) аминокислотные остатки, содержащиеся в СН3-участке Н-цепи в положениях 357 и 370 согласно EU-нумерации; и (3) аминокислотные остатки, содержащиеся в СН3-участке Н-цепи в положениях 399 и 409 согласно EU-нумерации.

Кроме того, антитело может представлять собой антитело, в котором пары аминокислотных остат-

ков в СНЗ-участке второй Н-цепи, отличном от указанного выше СНЗ-участка первой Н-цепи, выбраны из вышеуказанных пар аминокислотных остатков, указанных в подпунктах (1)-(3), при этом, одна-три пары аминокислотных остатков, которые соответствуют вышеуказанным парам аминокислотных остатков, указанных в подпунктах (1)-(3), несущих один и тот же тип зарядов в указанном выше СНЗ-участке первой Н-цепи, несут заряды, противоположные зарядам соответствующих аминокислотных остатков в указанном выше СНЗ-участке первой Н-цепи.

Каждый из аминокислотных остатков, указанных выше в подпунктах (1)-(3), приближаются друг к другу в процессе ассоциации. Специалисты в данной области могут установить положения, которые соответствуют вышеуказанным аминокислотным остаткам, которые указаны в подпунктах (1)-(3), в требуемом СНЗ-участке Н-цепи или в константной области Н-цепи путем моделирования гомологии и т.п. с использованием поступающего в продажу программного обеспечения, аминокислотные остатки в этих положениях можно соответственно подвергать модификации.

В указанных выше антителах "заряженные аминокислотные остатки" предпочтительно выбирают, например, из любой из следующих групп:

(а) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); и

(б) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H).

Касательно указанных выше антител фраза "несут одинаковый заряд" означает, например, что все из двух или большего количества аминокислотных остатков выбраны из аминокислотных остатков, включенных в одну из указанных выше групп (а) и (б). Фраза "несут противоположные заряды" означает, например, что, когда по меньшей мере один из аминокислотных остатков среди двух или большего количества аминокислотных остатков выбран из аминокислотных остатков, включенных в любую из указанных выше групп (а) и (б), то остальные аминокислотные остатки выбраны из аминокислотных остатков, включенных в другую группу.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в указанных выше антителах СНЗ-участок первой Н-цепи и СНЗ-участок второй Н-цепи могут быть перекрестно сшиты дисульфидными связями.

В настоящем описании аминокислотные остатки, подвергнутые модификации, не ограничены вышеуказанными аминокислотными остатками переменных областей антитела или константных областей антитела. Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислотные остатки, которые образуют границу раздела в мутантных полипептидах или гетеромультимерах путем моделирования гомологии и т.п. с использованием поступающего в продажу программного обеспечения; и аминокислотные остатки в этих положениях можно подвергать модификации с целью регулирования ассоциации.

Кроме того, другие известные методики можно применять также для создания мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении. Ассоциацию полипептидов, имеющих различные последовательности, можно эффективно индуцировать путем комплементарной ассоциации СНЗ с использованием сконструированного на основе обмена цепей СНЗ-домена, полученного путем замены части одного из СНЗ-участков Н-цепей антитела на соответствующую последовательность, полученную из IgA, и интродукции соответствующей полученной из IgA последовательности в комплементарный участок СНЗ другой Н-цепи (Protein Engineering Design & Selection, 23, 2019, сс. 195-202). Указанную известную методику можно также эффективно применять для создания представляющих интерес мультиспецифических антигенсвязывающих молекул.

Кроме того, для создания мультиспецифических антител можно применять методики получения антител с использованием ассоциации CH1 и CL антитела и ассоциации VH и VL антитела, описанные в WO 2011/028952, WO 2014/018572 и в Nat Biotechnol. 32(2), февраль 2014 г., сс. 191-198; методики получения биспецифических антител с использованием в комбинации отдельно полученных моноклональных антител (обмен Fab-плечами), описанные в WO 2008/119353 и WO 2011/131746; методики регуляции ассоциации между СНЗ-доменами тяжелых цепей антител, описанные в WO 2012/058768 и WO 2013/063702; методики получения мультиспецифических антител, созданных на основе двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, описанные в WO 2012/023053; методики получения мультиспецифических антител с использованием двух линий бактериальных клеток, каждая из которых экспрессирует одну из цепей антитела, содержащего одну Н-цепь и одну L-цепь, описанные у Christoph и др., Nature Biotechnology т. 31, 2013, сс. 753-758); и т.п.

Альтернативно этому, даже в том случае, когда не удастся эффективно конструировать представляющую интерес мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, можно получать путем сепарации и очистки представляющей интерес мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы из полученных молекул. Например, ранее описан метод очистки двух типов гомомерных форм и представляющего интерес гетеромерного антитела с помощью ионообменной хроматографии путем придания им различия в изоэлектрических точках посредством интродукции аминокислотных замен в переменные области двух типов Н-цепей (WO 2007114325). К настоящему времени в качестве метода очистки гетеромерных антител описаны методы с применением белка А для очистки гетеродимерного антитела, содержащего Н-цепь мышинового IgG2a, которая связывается с белком

А, и Н-цепь крысиного IgG2b, которая не связывается с белком А (WO 98/050431 и WO 95/033844). Кроме того, гетеродимерное антитело само по себе можно эффективно очищать с использованием Н-цепей, содержащих замену аминокислотных остатков в положениях согласно EU-нумерации 435 и 436, которые представляют собой сайт связывания IgG-белок А, на Туг, His или т.п., которые представляют собой аминокислоты, обеспечивающие другую аффинность к белку А, или с использованием Н-цепей с различной аффинностью к белку А для изменения взаимодействия каждой из Н-цепей с белком А, а затем применения колонки с белком А.

Кроме того, Fc-область, которая представляет собой Fc-область с улучшенной С-концевой гетерогенностью, можно применять соответственно в качестве Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены Fc-области, полученные путем делеции глицина в положении 446 и лизина в положении 447 согласно EU-нумерации из аминокислотных последовательностей двух полипептидов, образующих Fc-область, имеющую происхождение из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, полученные согласно методу, указанному в настоящем описании, можно очищать с помощью известных в данной области методик, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, должны зависеть, в том числе, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и др., и должны быть очевидны специалистам в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно применять лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула. Например, для мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, с помощью аффинной хроматографии можно применять матрицу с белком А или белком G. Для выделения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно использовать последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации. Чистоту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять любым из множества хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п.

Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность.

Понятие "антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), которые присутствуют на некоторых цитотоксических клетках (например, на NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах), обеспечивает способность указанных цитотоксических эффекторных клеток специфически связываться с несущими антиген клетками-мишенями и затем уничтожать клетки-мишени с помощью цитотоксинов. Первичные клетки, опосредующие ADCC, т.е. NK-клетки, экспрессируют только Fc-гамма RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII. Данные об экспрессии FcR на гематопоэтических клетках обобщены в таблице 3 на с. 464 у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, сс. 457-492. Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы можно осуществлять *in vitro* ADCC-анализ, например, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337 или в патенте США № 6737056 (на имя Presta). Пригодные для такого анализа эффекторные клетки включают РВМС и NK-клетки. В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, согласно методу, описанному у Clynes и др., *PNAS (USA)* 95, 1998, сс. 652-656.

Комплементзависимая цитотоксичность.

Понятие "комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути системы комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с когнатным для них антигеном. Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., *J. Immunol. Methods* 202, 1996, с. 163). Полипептидные варианты с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области (полипептиды с вариантом Fc-области) и повышенной или пониженной C1q-связывающей способностью описаны, например, в патенте США № 6194551 B1 и WO 1999/51642 (см. также, например, Idusogie и др., *J. Immunol.* 164, 2000, сс. 4178-4184).

Зависящая от Т-клетки клеточная цитотоксичность.

Понятие "зависящая от Т-клетки клеточная цитотоксичность" или "TDCC" относится к форме цитотоксичности, при которой антигенсвязывающая молекула связывается как с антигеном, который экспрессируется на клетке-мишени, так и с другим антигеном, который экспрессируется на Т-клетке, что приводит к переориентации Т-клетки, приводящей к ее сближению с клеткой-мишенью, в результате индуцируется присущая Т-клетке цитотоксичность в отношении клетки-мишени. Метод оценки зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности, а именно, *in vitro* TDCC-анализ, представлен также в настоящем описании в разделе "Измерение зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности".

Измерение зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности.

В варианте осуществления изобретения, в котором антигенсвязывающая молекула связывается как

с CLDN6, так и с CD3/CD137, описанные ниже методы предпочтительно используют в качестве метода оценки или выявления зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности (TDCC), вызываемой контактом антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, с CLDN6-экспрессирующими клетками, с которыми связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающих молекулах, представленных в настоящем описании. Методы оценки или выявления цитотоксической активности *in vitro* включают методы определения активности цитотоксических Т-клеток или т.п. Обладает ли антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, активностью в отношении индукции опосредуемой Т-клеткой клеточной цитотоксичности, можно определять с помощью известных методов (см., например, Current protocols in Immunology, глава 7. Immunologic studies in humans, под ред. John E. Coligan и др., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 1993). При осуществлении анализа цитотоксичности антигенсвязывающую молекулу, которая обладает способностью связываться с антигеном, отличным от CLDN6, и который не экспрессируется в клетках, и CD3/CD137, применяют в качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы. Контрольную антигенсвязывающую молекулу анализируют аналогичным образом. Затем активность оценивают путем тестирования того, обладает ли антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, более сильной цитотоксической активностью по сравнению с контрольной антигенсвязывающей молекулой.

При этом, противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивают или выявляют, например, с помощью следующей процедуры. Клетки, экспрессирующие антиген, с которым связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающей молекуле, представленной в настоящем описании, трансплантируют внутрикожно или подкожно животному кроме человека. Затем в день трансплантации или позднее вводят тестируемую антигенсвязывающую молекулу в вену или брюшную полость каждый день или с интервалом в несколько дней. Измеряют размер опухолей в зависимости от времени. Различие в изменении размера опухолей можно принимать за цитотоксическую активность. Аналогично процедуре, описанной для анализа *in vitro*, вводят контрольную антигенсвязывающую молекулу. Можно считать, что антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, обладает цитотоксической активностью, если размер опухолей меньше в группе, обработанной антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, по сравнению с группой, обработанной контрольной антигенсвязывающей молекулой.

МТТ-метод и измерение поглощения меченого изотопом тимидина клетками предпочтительно применяют для оценки и выявления воздействия контакта с антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, на подавление роста клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающей молекуле. При этом, такие же методы, как и методы, описанные выше для оценки или выявления *in vivo* цитотоксической активности, можно предпочтительно применять для оценки или выявления активности в отношении подавления клеточного роста *in vivo*.

TDCC антитела или антигенсвязывающей молекулы, представленного/представленной в описании, можно оценивать с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области. Например, TDCC можно измерять с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). При осуществлении этого анализа клетки-мишени (например, CLDN6-экспрессирующие клетки) инкубируют с Т-клетками (например, PBMC) в присутствии тестируемого/тестируемой антитела или антигенсвязывающей молекулы и активность LDH, которая высвободилась из клеток-мишеней в результате обусловленного Т-клетками цитолиза, измеряют с помощью приемлемого реагента. Как правило, цитотоксическую активность рассчитывают в виде процента активности LDH, возникающей при инкубации с антителом или антигенсвязывающей молекулой, относительно активности LDH в результате цитолиза 100% клеток-мишеней (например, лизированных путем обработки Тритоном-X). Если цитотоксическая активность, рассчитанная с помощью описанного выше метода, выше, то считают, что тестируемое/тестируемая антитело или антигенсвязывающая молекула обладает более высокой TDCC.

В дополнительном или альтернативном варианте, например, TDCC можно измерять также с помощью анализа ингибирования роста клеток в реальном времени. При осуществлении этого анализа клетки-мишени (например, CLDN6-экспрессирующие клетки) инкубируют с Т-клетками (например, PBMC) в присутствии тестируемого антитела или тестируемой антигенсвязывающей молекулы в 96-луночном планшете и осуществляют мониторинг роста клеток-мишеней с помощью методов, известных в данной области, например, используя приемлемый анализатор (например, анализатор клеток в реальном времени (Real-Time Cell Analyzer) xCELLigence). Уровень ингибирования клеточного роста (CGI: %) определяют на основе величины клеточного индекса согласно следующей формуле $CGI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$ - " CI_{Ab} " обозначает величину клеточного индекса в лунках с антителом или антигенсвязывающей молекулой в конкретный экспериментальный момент времени, а " CI_{NoAb} " обозначает среднюю величину клеточного индекса в лунках без антитела или антигенсвязывающей молекулы. Если CGI-уровень антитела или антигенсвязывающей молекулы является высоким, т.е. представляет собой значительную положительную величину, то можно считать, что антитело или антигенсвязывающая молекула обладает TDCC-активностью.

Согласно одному из объектов изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула, представ-

ленное/представленная в описании, обладает способностью индуцировать Т-клеточную активацию. Т-клеточную активацию можно оценивать с помощью методов, известных в данной области, например, метода, в котором используют сконструированную линию Т-клеток, экспрессирующую репортерный ген (например, люциферазу), в ответ на их активацию (например, репортерная клеточная линия. Jurkat/NFAT-RE (биологический анализ Т-клеточной активации (T Cell Activation Bioassay), фирма Promega)). При осуществлении этого метода клетки-мишени (например, CLDN6-экспрессирующие клетки) культивируют с Т-клетками в присутствии тестируемого/тестируемой антитела или антигенсвязывающей молекулы, а затем уровень активности продукта экспрессии репортерного гена измеряют с помощью соответствующего метода, например, на основе определения показателя Т-клеточной активации. Когда репортерный ген представляет собой ген люциферазы, то можно измерять люминесценцию, возникающую в результате реакции между люциферазой и ее субстратом, в качестве показателя Т-клеточной активации. Если Т-клеточная активация, измеренная с помощью описанного выше метода, является более высокой, то считают, что тестируемое антитело или тестируемая антигенсвязывающая молекула обладает более высокой способностью индуцировать Т-клеточную активацию.

Фармацевтическая композиция.

В одном из объектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, представленная в описании, индуцирует зависящую от Т-клеток цитотоксичность, иными словами, фармацевтическая композиция, представленная в описании, представляет собой терапевтический агент, предназначенный для индукции клеточной цитотоксичности. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой фармацевтическую композицию, применяемую для лечения и/или предупреждения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой фармацевтическую композицию, применяемую для лечения и/или предупреждения CLDN6-положительного рака или CLDN6-экспрессирующего рака, включая рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоль из половых клеток. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой подавляющий рост клеток агент. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой противораковый агент.

Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, терапевтический агент, предназначенный для индукции клеточной цитотоксичности, подавляющий клеточный рост агент или противораковый агент, представленные в настоящем описании, можно готовить при необходимости с использованием различных типов антигенсвязывающих молекул или антител. Например, цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих антиген, можно повышать с помощью смеси из нескольких антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании.

Фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленную в настоящем описании, готовят путем смешения указанной антигенсвязывающей молекулы или указанного антитела, имеющей/имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. под ред. Osol A., 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и они включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания примеры фармацевтически приемлемых носителей включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как gHuPH20 (HYL-ENEX®, фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе gHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в патенте США № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции содержат гистидин-ацетатный буфер.

Препаративная форма, указанная в настоящем описании, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно веществ с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Указанные действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для достижения поставленной цели.

При необходимости антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, можно включать в микрокапсулы (микрокапсулы, полученные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли[метилметакрилата] и т.п.), и приготавливать в качестве компонентов коллоидных систем введения лекарственного средства (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и наночапсулы) см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980). Кроме того, известны методы приготовления средств в виде агентов с замедленным высвобождением, и их можно применять для антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, сс. 267-277; Chemtech. 12, 1982, сс. 98-105; US № 3773719; заявки на Европейский патент (EP) №№. EP58481 и EP133988; Biopolymers 22, 1983, сс. 547-556).

При необходимости векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, можно интродуцировать индивидуумам для экспрессии антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании, непосредственно в организме индивидуума. Примером векторов, которые можно использовать являются (но не ограничиваясь только им) аденовирус. Можно также вводить молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, индивидууму непосредственно или вводить молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, индивидууму путем электропорации или вводить клетки, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, которые могут экспрессироваться или секретироваться в организме индивидуума, для постоянной экспрессии и секреции антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании, в организме индивидуума.

Фармацевтические композиции, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно вводить пациентам либо орально, либо парентерально. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, такие методы введения включают инъекцию, назальное введение, транспульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутривнутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты, предназначенные для индукции клеточной цитотоксичности, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно применять местно или вводить системно с помощью инъекции. Кроме того, соответствующие методы введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Предназначенную для введения дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,0001 мг до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,001 до 100000 мг/на пациента. Однако доза фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, не ограничена указанными дозами.

Предпочтительно представленная в настоящем описании фармацевтическая композиция содержит антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании. В одном из объектов изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения для индукции клеточной цитотоксичности. В другом объекте изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения для лечения или предупреждения рака. Предпочтительно рак представляет собой колоректальный рак или рак желудка. Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно применять для лечения или предупреждения рака. Так, в настоящем описании предложен способ лечения или предупреждения рака, в котором пациенту, который нуждается в этом, вводят антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании.

В настоящем описании предложены также способы повреждения клеток, экспрессирующих CLDN6 или CLDN6-позитивных раковых клеток, или подавления клеточного роста путем приведения в контакт клеток, экспрессирующих CLDN6, с антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, которая связывается с CLDN6. Клетки, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, не ограничены конкретно, если они экспрессируют CLDN6. В частности, согласно настоящему описанию предпочтительный экспрессирующий CLDN6 рак или CLDN6-позитивный рак включает рак яичника, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоли из половых клеток.

Согласно настоящему описанию "контакт" можно осуществлять, например, добавляя антигенсвязыва-

вающую молекулу, представленную в настоящем описании, в культуральные среды клеток, экспрессирующих CLDN6, которые культивируют *in vitro*. В этом случае добавляемую антигенсвязывающую молекулу можно использовать в соответствующей форме, такой как раствор или твердый продукт, полученный лиофилизацией, или т.п. Когда антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, добавляют в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанные выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, забуферивающий агент, суспендирующий агент, регулирующий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливающее вещество, усилитель текучести и корригент. Добавляемая концентрация не ограничена конкретно; однако конечная концентрация в культуральной среде предпочтительно составляет от 1 пг/мл до 1 г/мл, более предпочтительно от 1 нг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 1 мкг/мл до 1 мг/мл.

В другом варианте осуществления изобретения согласно настоящему описанию "контакт" можно осуществлять также путем введения животным кроме человека, которым трансплантированы CLDN6-экспрессирующие клетки *in vivo*, или животным, которые имеют раковые клетки, эндогенно экспрессирующие CLDN6. Метод введения может быть оральным или парентеральным. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, метод парентерального введения включает инъекцию, назальное введение, транспульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты, предназначенные для индукции клеточной цитотоксичности, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно применять местно или вводить системно с помощью инъекции. Кроме того, соответствующий метод введения можно выбирать в зависимости от возраста животного и симптомов. Когда антигенсвязывающую молекулу вводят в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанные выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, забуферивающий агент, суспендирующий агент, регулирующий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливающее вещество, усилитель текучести и корригент. Вводимую дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,001 до 100000 мг на каждого пациента. Однако доза антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, не ограничена указанными примерами.

В настоящем описании предложены также наборы, предназначенные для применения в способе, представленном в настоящем описании, которые содержат антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, или антигенсвязывающую молекулу, полученную способом, представленным в настоящем описании. Наборы могут быть упакованы вместе с дополнительным фармацевтически приемлемым носителем или средой или инструкцией по применению, в которой указано, как применять наборы, и т.д.

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые находятся в контейнере. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластика. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антители, предлагаемое в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, которая содержит антители, предлагаемое в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический или другой терапевтический агент. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать также листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Листовка-вкладыш в упаковку.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" относится к инструкциям, которые обычно входят в по-

ступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

Фармацевтическая препаративная форма.

Понятие "фармацевтическая препаративная форма" или "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность входящего в ее состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и которая не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

Фармацевтически приемлемый носитель.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической препаративной форме, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Лечение.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, применяются для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Рак.

Понятия "рак" и "злокачественное" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом/нерегулируемой пролиферацией клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой CLDN6-экспрессирующий или CLDN6-позитивный рак, который включает рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия или опухоль из половых клеток; и другой CLDN6-позитивный рак или CLDN6-экспрессирующий рак.

Опухоль.

Понятие "опухоль" относится к росту и пролиферации всех неопластических клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, и всех предраковых и раковых клеток и тканей. Понятия "рак", "злокачественный", "пролиферативное нарушение клеток", "пролиферативное нарушение" и "опухоль" не являются взаимоисключающими при ссылке на них в настоящем описании.

Другие агенты и варианты лечения.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими агентами, применяемыми в терапии. Например, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Под понятие "терапевтический агент" подпадает любой агент, который вводят индивидууму, который нуждается в таком лечении, для лечения симптома или заболевания. Указанный дополнительный терапевтический агент может включать любые действующие вещества, пригодные для лечения конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно агенты с дополнительными видами активности, которые не оказывают вредного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулятор, цитостатический агент, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксический агент, активатор апоптоза клеток или агент, который повышает чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый агент, например, разрушитель микротрубочек, антимаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, гормональную терапию, ингибитор киназы, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенный агент.

Указанные другие агенты могут присутствовать в комбинации в количествах, в которых они эффективны для поставленной цели. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества применяемых мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, как правило, применяются в тех же дозах и с использованием путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от доз, указанных в настоящем описании, или в любой дозе и с помощью любого пути введения, которые эмпирически/клинически рассматриваются как пригодные.

Указанные выше комбинированные терапии включают совместное введение (при котором два или большее количество терапевтических агентов включают в одну и ту же композицию или в разные композиции) и раздельное введение, в случае которого введение мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, можно осуществлять до, одновременно и/или после введение дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

Все документы, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки.

Ниже представлены примеры методов и композиций, применяемых в настоящем описании. Должно быть очевидно, что на практике можно воплощать другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше подробного описания.

Примеры

Пример 1.

Скрининг варианта с созревшей аффинностью родительского Dual-Fab H183L072 для повышения цитотоксичности *in vitro* в отношении опухолевых клеток.

1.1 Последовательность вариантов с созревшей аффинностью.

Для повышения аффинности связывания родительского Dual-Fab H183L072 (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 90; легкая цепь: SEQ ID NO: 142) создавали более 1000 вариантов Dual-Fab с использованием H183L072 в качестве матрицы для интродукции одной или нескольких мутаций в вариабельную область. Антитела экспрессировали с использованием Expi293 (фирма Invitrogen) и очищали с помощью белка А с последующей гель-фильтрацией, если гель-фильтрация требовалась. Последовательности 15 репрезентативных вариантов Dual-Fab с несколькими мутациями представлены в таблице 1, и их кинетику связывания оценивали при 25°C и/или 37°C, используя устройство Biacore T200 (фирма GE Healthcare) согласно методу, описанному в примере 1.2.2.

Таблица 1

Обозначение варианта	Обозначение VH	Обозначение VL	SEQ ID NO								
			VH	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	VL	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	
H183L072	dBBDu183H	dBBDu072L	90	103	116	129	142	147	152	157	
H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	91	104	117	130	143	148	153	158	
H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	92	105	118	131	144	149	154	159	
H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	93	106	119	132	143	148	153	158	
H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	94	107	120	133	143	148	153	158	
H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	94	107	120	133	145	150	155	160	
H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	95	108	121	134	143	148	153	158	
H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	96	109	122	135	143	148	153	158	
H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	97	110	123	136	143	148	153	158	
H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	97	110	123	136	146	151	156	161	
H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	98	111	124	137	143	148	153	158	
H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	99	112	125	138	146	151	156	161	
H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	100	113	126	139	146	151	156	161	
H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	100	113	126	139	143	148	153	158	
H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	101	114	127	140	143	148	153	158	
H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	102	115	128	141	143	148	153	158	
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	162				163				
CD137	CD137VH	CD137VL	164				165				

1.2. Информация о кинетике связывания вариантов с созревшей аффинностью.

1.2.1 Экспрессия и очистка человеческих CD3 и CD137 Гамма- и эписон-субъединицы комплекса человеческого CD3 (человеческий CD3εg-линкер) связывали с помощью 29-мерного линкера и Flag-метку сливали с С-концом гамма-субъединицы (SEQ ID NO: 169). Указанную конструкцию кратковременно экспрессировали, используя клеточную линию FreeStyle293F (фирма Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую конструкцию человеческого CD3εg-линкер, концентрировали, используя колонку, упакованную смолами Q HP (фирма GE Healthcare), после чего применяли аффинную хроматографию с FLAG-меткой. Фракции, содержащие конструкцию человеческого CD3εg-линкер, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную 1xD-3ФР. Затем объединяли фракции, содержащие конструкцию человеческого CD3εg-линкер, и хранили при -80°C.

Внеклеточный домен (ECD) человеческого CD137 (человеческий CD137 ECD) (SEQ ID NO: 179) с гексагистином (His-метка) и пептидом-акцептором биотина (BAP) на его С-конце кратковременно экспрессировали, используя клеточную линию FreeStyle293F (фирма Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую ECD человеческого CD137, вносили на колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare) и элюировали с помощью буфера, содержащего имидазол (фирма Nacalai). Фракции, содержащие ECD человеческого CD137, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную 1xD-3ФР. Затем фракции, содержащие ECD человеческого CD137, объединяли, и хранили при -80°C.

1.2.2 Измерение аффинности в отношении человеческих CD3 и CD137 Аффинность связывания антител Dual-Fab (Dual-Ig) с человеческим CD3 оценивали при 25°C, используя устройство Biacore T200 (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc (фирма GE Healthcare) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4, используя набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). Антитела иммобилизовывали на сенсорных поверхностях, содержащих антитело к Fc, затем на проточные ячейки инъецировали рекомбинантный человеческий CD3 или CD137. Все антитела и аналиты приготавливали в буфере ACES, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃. После каждого цикла сенсорную поверхность регенерировали с помощью 3М MgCl₂. Аффинность связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1, используя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare). Анализ аффинности связывания с CD137 осуществляли в таких же условиях, за исключением того, что температуру анализа устанавливали на 37°C. Данные об аффинности связывания антител Dual-Fab с рекомбинантными человеческими CD3 и CD137 представлены в таблице 2 (обозначение E, используемое для выражения значений K_{on}, K_{off} и KD в таблице, означает "10 в степени" и, например, 3,54E+04 = 3,54×10⁴).

Таблица 2

	CD3			CD137		
	K _{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	K _{off} (c ⁻¹)	KD (M)	K _{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	K _{off} (c ⁻¹)	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

Пример 2. Рентгенографический анализ кристаллической структуры комплекса H0868L0581/hCD137.

2.1. Получение антитела для сокристаллического анализа.

Антитело H0868L581 было выбрано для анализа сокристалла с белком hCD137. Двухвалентное антитело применяли для кратковременной трансфекции и осуществляли его экспрессию с использованием системы экспрессии Expi293 (фирма Thermo Fisher Scientific). Супернатанты культуры собирали и антитела очищали из супернатантов с помощью аффинной хроматографии на колонке MabSelect SuRe (фирма GE Healthcare), а затем гель-фильтрации с использованием Супердекс 200 (фирма GE Healthcare).

2.2. Экспрессия и очистка внеклеточного домена (24-186) человеческого CD137.

Внеклеточный домен человеческого CD137, слитый с Fc посредством расщепляемого фактором Ха линкера (CD137-FFc, SEQ ID NO: 166), экспрессировали в клетках HEK293 в присутствии кифунензина. CD137-FFc очищали из культуральной среды с помощью аффинной хроматографии (колонка HiTrap Mab Select SuRe, фирма GE Healthcare), гель-фильтрации (колонка HiLoad 16/600 Супердекс 200 pg, фирма GE healthcare). Fc отщепляли с использованием фактора Ха и полученный в результате этого внеклеточный домен CD137 подвергали дополнительной очистке с использованием tandemно объединенных колонок для гель-фильтрации (HiLoad 16/600 Супердекс 200 pg, фирма GE healthcare) и колонки с белком А (HiTrap Mab Select SuRe 1ml, фирма GE Healthcare) и после этого очищали с использованием бензамидинсефарозной смолы (фирма GE Healthcare). Объединяли фракции, содержащие внеклеточный домен CD137, и помещали на хранение при -80°C.

2.3. Получение Fab-фрагмента H0868L0581 и контрольного антитела к CD137.

Для проведения анализа кристаллической структуры осуществляли кратковременную трансфекцию антител и их экспрессию с использованием системы экспрессии Expi293 (фирма Thermo Fisher Scientific). Собирали супернатанты культуры и антитела очищали из супернатантов с помощью аффинной хроматографии на колонке Mab Select SuRe (фирма GE Healthcare) и последующей гель-фильтрации с использованием Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Fab-фрагменты H0868L0581 и известное контрольное антитело к CD137 (ниже обозначено как 137Ctrl, тяжелая цепь SEQ ID NO: 167, легкая цепь SEQ ID NO: 168) получали общепринятым методом с использованием ограниченного расщепления с помощью Lys-C (фирма Roche), после чего загружали на колонку с белком А (MabSleet SuRe, фирма GE Healthcare) для

удаления Fc-фрагментов, на катионообменную колонку (HiTrap SP HP, фирма GE Healthcare) и колонку для гель-фильтрации (Супердекс 200 16/60, фирма GE Healthcare). Объединяли фракции, содержащие Fab-фрагмент, и помещали на хранение при -80°C.

2.4. Получение комплекса, содержащего Fab H0868L0581, 137Ctrl и человеческий CD137.

Очищенный CD137 смешивали со слитой с GST-меткой эндогликозидазой F1 (полученная в лаборатории заявителей) для дегликозилирования, после чего CD137 очищали на колонке для гель-фильтрации (HiLoad 16/600 Супердекс 200 pg, фирма GE healthcare) и колонке с белком А (HiTrap Mab-Select SuRe 1 ml, фирма GE Healthcare). Очищенный CD137 смешивали с Fab H0868L0581. Комплекс очищали на колонке для гель-фильтрации (Супердекс 200 Increase 10/300 GL, фирма GE healthcare) и затем очищенный комплекс, содержащий Fab H0868L0581 и CD137, смешивали с 137Ctrl. Тройной комплекс очищали с помощью гель-фильтрации (Супердекс 200 10/300 increase, фирма GE Healthcare) с использованием колонки, уравновешенной 25мМ HEPES, pH 7,3, 100мМ NaCl.

2.5. Кристаллизация.

Очищенные комплексы концентрировали до примерно 10 мг/мл и осуществляли кристаллизацию методом диффузии паров, применяя вариант "сидящей" капли при 21°C. Раствор в резервуаре содержал 0,1М Трис-гидрохлорид, pH 8,5, 25,0 об.% монометилового эфира полиэтиленгликоля 550.

2.6. Сбор данных и определение структуры.

Данные о дифракции рентгеновских лучей получали с помощью устройства X06SA на синхротроне (SLS). В процессе измерений кристалл постоянно находился в потоке азота при -178°C для поддержания его в замороженном состоянии, и собирали в общей сложности 1440 картин дифракции рентгеновских лучей с использованием детектора Eiger X16M (фирма DECTRIS), помещенного на оси пучка, осуществляя каждый раз поворот кристалла на 0,25 градуса. Определение параметров элементарных ячеек, индексацию дифракционных пятен и обработку данных о дифракции, полученных из картин дифракции, осуществляли с использованием программы autoPROC (Acta. Cryst. D67, 2011, сс. 293-302), пакета программ XDS (Acta. Cryst. D66, 2010, сс. 125-132) и AIMLESS (Acta. Cryst. D69, 2013, сс. 1204-1214), и в итоге получали данные о дифракционной интенсивности с разрешением вплоть до 3,705 Å. Результаты статистической обработки кристаллографических данных представлены в табл. 3.

Структуру определяли методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (J. Appl. Cryst. 40, 2007, сс. 658-674). Поисковую (стартовую) модель получали на основе опубликованной кристаллической структуры (PDB code: 4NKI и 6MI2). Модель строили с использованием программы Coot (Acta Cryst. D66, 2010, сс. 486-501) и уточняли с использованием программы Refmac5 (Acta Cryst. D67, 2011, сс. 355-367). Кристаллографический фактор достоверности (R) для данных о дифракционной интенсивности при разрешении 77,585-3,705 Å составлял 22,33%, при этом величина Free R составляла 27,50%. Уточненные статистические данные о структуре представлены в табл. 3.

Таблица 3

Собранные рентгенографические данные и уточненные статистические данные

Собранные данные

Пространственная группа	C2
Элементарная ячейка	
a, b, c (Å)	233.795, 74.019, 81.986
α, β, γ (°)	90.000, 108.858, 90.000
Разрешение (Å)	77.585–3.705
Полные отражения	99,488
Уникальные отражения	14,221
Полнота (оболочка максимального разрешения) (%)	99.2 (99.7)
R_{merge}^a (оболочка максимального разрешения)	0.161 (1.052)

Уточнение

Разрешение	48.822–3.705
Отражения	14,195
R_{factor}^b (R_{free}^a) (%)	22.33 (27.50)
C.К.О. – отклонение от идеального	
Длины связей (Å)	0.003
Углы связей (°)	0.618

$$a; R_{\text{merge}} = \frac{\sum hkl \sum j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum j I_j(hkl)}, \text{ где } I_j(hkl) \text{ и } \langle I(hkl) \rangle$$

обозначают интенсивность измеряемого параметра j и среднюю интенсивность отражения с индексом hkl соответственно

$$b; R \text{ factor} = \frac{\sum hkl |F_{\text{calc}}(hkl)| - |F_{\text{obs}}(hkl)|}{\sum hkl |F_{\text{obs}}(hkl)|},$$

где F_{obs} и F_{calc} обозначают измеренные и рассчитанные амплитуды структурного фактора с;

R_{free} рассчитывали с использованием 5% отражений, отобранных случайным

2.7. Идентификация сайтов взаимодействия Fab H0868L0581 и CD137 Кристаллическую структуру тройного комплекса Fab H0868L0581, 137Ctrl и CD137 определяли при разрешении 3,705 Å. На фиг. 1 и 2 картирована контактная область эпитопа Fab H0868L0581 в аминокислотной последовательности CD137 и в кристаллической структуре соответственно. Эпитоп включает аминокислотные остатки CD137, которые содержат один или несколько атомов, локализованных в пределах 4,5 Å от любой части Fab H0868L0581 в кристаллической структуре. Кроме того, на фиг. 1 и фиг. 2 выделен цветом эпитоп, находящийся в пределах 3,0 Å.

Как проиллюстрировано на фиг. 1 и 2, кристаллическая структура характеризуется тем, что L24-N30 в CRD1 CD137, связанные в кармане, образованном между тяжелой цепью и легкой цепью Fab H0868L0581, прежде всего L24-S29, глубоко погружены в него таким образом, что N-конец CD137 ориентирован вглубь кармана. Кроме того, N39-I44 в CRD1 и G58-I64 в CRD2 в CD137 распознаются CDR-участками тяжелой цепи Fab H0868L0581. CRD является обозначением доменов, разделенных состоящими из Cys-Cys структурами, обозначенных как CRD-референс, что описано в WO 2015/156268.

При создании изобретения было идентифицировано антитело к человеческому CD137, которое распознает N-концевую область, прежде всего L24-N30, человеческого CD137 и было установлено также, что антитело к указанной области может активировать CD137 на клетках.

Пример 3. Создание триспецифического антитела CLDN6/Dual-Fab.

Триспецифические антитела с одним плечом, таргетирующим клаудин-6, и другим плечом с функцией двойного таргетирования CD3 и CD137 создавали, используя FAST-Ig (WO 2013/065708) или технологию CrossMab (фиг. 3). Антиген-мишень для каждой Fv-области в триспецифических антителах представлен в табл. 4. Правило обозначения каждой цепи показано на фиг. 3, а SEQ ID NO: представлены в табл. 5. Последовательность каждой вариабельной области представлена в табл. 6.

Fc-область была молчащей касательно Fc-гамма R и дегликозилированной. Для улучшения ФК антител использовали усиливающие FcRn мутации Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E). Сконструированные компоненты, применяемые в каждом антителе, представлены в табл. 7-1 и 7-2, при этом более подробное описание FAST06, FAST22 и FAST30 представлено в табл. 8. Все антитела экспрессировали в триспецифическом формате путем кратковременной экспрессии в клетках Expi293 (фирма Invitrogen) и их очищали согласно методу, описанному в референс-примере 1.

Таблица 4

Обозначения антител и обозначения Fv

ID антитела	Обозначение	Формат антитела	Fv A (анти-CLDN6)	Fv B (Dual Fab)
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE05KE
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE15KE
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE05KE
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE15KE
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15

Обозначения антител и SEQ ID NO:

ID антитела	Обозначение антитела	SEQ ID NOs			
		Цепь 1	Цепь 2	Цепь 3	Цепь 4
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326	41	50	54	68
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326	41	50	55	68
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326	42	51	56	69
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326	42	51	57	69
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11	44	52	60	70
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11	44	52	61	70
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	45	50	62	68
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	45	50	63	68
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	46	51	64	69
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	46	51	65	69
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	47	52	66	70
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	47	52	67	70
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326	48	53	56	71
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326	48	53	57	71
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	49	53	64	71
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	49	53	65	71
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11	43	52	58	70
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11	43	52	59	70

Таблица 6

Обозначения Fv, VH, VL и SEQ ID NO их CDR 1 -3

Обозначение Fv	Варибельная область в той же полипептидной цепи, что и константная область тяжелой цепи	Варибельная область в той же полипептидной цепи, что и константная область легкой цепи	SEQ ID NO							
			Варибельная область в той же полипептидной цепи, что и константная область тяжелой цепи				Варибельная область в той же полипептидной цепи, что и константная область легкой цепи			
			Вариаб	CDR1	CDR2	CDR3	Вариаб	CDR1	CDR2	CDR3
CLDN6AE25EK	65HQ39E	54L0532Q38K	2	8	14	20	26	30	34	38
CLDN6AE25	65H	54L0532	1	7	13	19	25	29	33	37
xCLDN6AE25	54L0532	65H	25	29	33	37	1	7	13	19
DualAE05KE	dBBDu183H1643.Q39K	dBBDu072L0581.Q38E	3	9	15	21	27	31	35	39
DualAE15KE	dBBDu183H2594.Q39K	dBBDu072L0581.Q38E	4	10	16	22	27	31	35	39
DualAE05	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	5	11	17	23	28	32	36	40
DualAE15	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	6	12	18	24	28	32	36	40

Таблица 7-1

Сконструированные компоненты, применяемые для каждого антитела

ID антитела	Обозначение антитела	Усиление связывания FcRn	Спаривание H/L	Спаривание тяжелой цепи
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326		FAST6	S3
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326		FAST6	S3
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11		Cross-mab	«выступ-во впадину»
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11		Cross-mab	«выступ-во впадину»
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	«выступ-во впадину»
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	«выступ-во впадину»
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326		FAST30	S3
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326		FAST30	S3
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3

Продолжение таблицы 7-1

Таблица 7-2

ID антитела	Обозначение антитела	Усиление связывания FcRn	Спаривание H/L	Спаривание тяжелой цепи
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11		Cross-mab	«выступ-во впадину»
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11		Cross-mab	«выступ-во впадину»

Таблица 8

Подробная информация о конструктивных изменениях в переменных областях FAST-Ig

No.	Плечо Dual Fab (цепь 3 и цепь 4)										Плечо анти-CLDN6 (цепь 1 и цепь 2)									
	Тяжелая цепь (цепь 3)					Легкая цепь (цепь 4)					Тяжелая цепь (цепь 1)					Легкая цепь (цепь 2)				
	Q39	K147	Q175	K213	Q38	E123	S131	Q160	T180	Q39	K147	Q175	K213	Q38	E123	S131	Q160	T180		
FAST06	-	-	K	-	-	-	E	E			E	E				K	K			
FAST22	K	-	K	-	E	-	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K	K			
FAST30		-	K	-	-	-	E	E	E	E	E	E	E		K	K	K			

Пример 4. FACS-анализ специфичности в отношении белков семейства CLDN.

Аминокислотные последовательности CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9 являются высоко консервативными. Поэтому при создании изобретения оценивали специфичность связывания CLDN6 CLDN6-связывающей Fv-области, содержащей 65HQ39E в качестве VH и 54L0532Q38K в качестве VL, с помощью FACS-анализа. hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF и hCLDN9/BaF инкубировали с биспецифическим антителом анти-CLDN6/CD3 (CS2961), содержащим CLDN6-связывающую Fv CLDN6AE25EK и CD3-связывающую Fv (вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 184, вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 185), взятым в концентрации 15 мкг/мл. Другое биспецифическое антитело анти-CLDN6/CD3 (6PHU3/TR01) и антитело, не обладающее способностью связываться с CLDN6 (KLH/TR01), применяли в качестве контроля окрашивания. Антитела 6PHU3/TR01 и KLH/TR01 содержат такую же CD3-связывающую Fv-область (вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 188, вариабельная область легкой цепи SEQ ID NO: 189). CLDN6-связывающая Fv-область 6PHU3/TR01 содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая представлена в SEQ ID NO: 190, и вариабельную область легкой цепи, которая представлена в SEQ ID NO: 191. Антитело KLH/TR01 содержит KLH-связывающую Fv (вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 186, вариабельная область тяжелой цепи SEQ ID NO: 187).

Связывание каждого из антител определяли с использованием конъюгированного с Alexa Fluor 488 антитела к человеческому IgG (фирма Invitrogen). Мертвые клетки отделяли с помощью окрашивания с использованием eFlour 780 (фирма Invitrogen).

Как продемонстрировано на фиг. 4, для CS2961 установлена более высокая специфичность в отношении CLDN6 по сравнению с 6PHU3/TR01.

Пример 5. Измерение зависящей от Т клетки клеточной цитотоксичности биспецифических антител анти-CLDN6/CD3 и триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab.

На фиг. 5 представлены данные о зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности биспецифического антитела анти-CLDN6/CD3 (CS3348) и пяти триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab (PPU4134, PPU4135, PPU4136,

PPU4137 и PPU4138) в отношении клеток NIH:OVCAR-3 (линия клеток рака яичника с высоким уровнем экспрессии CLDN6) и A2780 и COV413A (линии клеток рака яичника с низким уровнем экспрессии CLDN6). Последовательности антител представлены в табл. 9.

Таблица 9

Обозначение антитела	Другое обозначение	SEQ ID NO			
		Цепь 1	Цепь 2	Цепь 3	Цепь 4
CS3348	-	193	195	194	192
PPU4134	Ab01	41	50	54	68
PPU4135	Ab03	42	51	56	69
PPU4136	Ab04	42	51	57	69
PPU4137	Ab17	43	52	58	70
PPU4138	Ab18	43	52	59	70

Клеточную цитотоксичность оценивали с помощью LDH-анализа с использованием человеческих РВМС. 15000 клеток-мишеней и 150000 человеческих РВМС (Е/Т =10) высевали в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном и инкубировали с антителом в различных концентрациях в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Цитолиз клеток-мишеней измеряли с помощью набора для детекции цитотоксичности с использованием LDH (фирма Takara Bio). Цитотоксическую активность (%) каждого антитела рассчитывали с помощью следующей формулы:

$$\text{Цитотоксическая активность (\%)} = (A - B - C) \times 100 / (D - C),$$

в которой "А" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, обработанных антителом и РВМС, "В" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, содержащих только эффекторные РВМС-клетки, "С" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, содержащих только необработанные клетки-мишени, и "D" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, в которых осуществляли лизис клеток-мишеней путем обработки Тритон-Х. Кроме того, цитотоксичность, рассчитанную в лунке, содержащей РВМС и клетки-мишени без антитела, принимали за 0%. Установлено, что все триспецифические антитела анти-CLDN6/Dual-Fab обладали зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичностью в отношении экспрессирующих CLDN6 клеток.

Пример 6. Создание дважды гуманизированных по CD137/CD3 мышей.

Штамм мышей с встроенным ("нокинг") (KI) человеческим CD137 создавали путем замены мышинной эндогенной геномной области CD137 на человеческую геномную последовательность CD137 с использованием мышинных эмбриональных стволовых клеток. Мышей с замененным CD3 EDG создавали в виде штамма, в котором все три компонента комплекса CD3: CD3e, CD3d и CD3g, заменены на их человеческие копии, CD3E, CD3D и CD3G (Scientific Rep.; 8, 2018, с. 46960). Дважды гуманизированный по CD137/CD3 мышинный штамм создавали путем кроссбридинга мышей с человеческим CD137 KI с мышами, несущих замену на человеческий CD3 EDG.

Пример 7. Оценка эффективности *in vivo* триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab на несущих hCD3/hCD137 мышах.

Оценку эффективности *in vivo* антител, полученных согласно методу, описанному в примере 3, проводили с использованием созданной на мышах модели опухоли.

Для оценки эффективности *in vivo* использовали созданных согласно методу, описанному в примере 6, дважды гуманизированных по CD3/CD137 мышей, которые ниже обозначены как "hCD3/hCD137-мышь". Клетки, характеризующиеся стабильной экспрессией человеческого CLDN6, трансплантировали hCD3/hCD137-мышам и hCD3/hCD137-мышей с подтвержденным образованием опухоли обрабатывали путем введения антител.

Более конкретно, при тестировании лекарственной эффективности антител с использованием моделей несущих опухоли (мышей) осуществляли описанные ниже тесты. CLDN6-экспрессирующие клетки (1×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в паховую область hCD3/hCD137-мышей. День трансплантации обозначали как день 0. В день 9 после трансплантации мышей разделяли случайным образом на группы в соответствии с их весом тела и размером опухоли. В день осуществления рандомизации вводили внутривенно в хвостовую вену антитела в дозе 6 мг/кг. Антитела вводили только один раз. Объем опухоли и вес тела измеряли через каждые 3-4 дня с использованием системы для тестирования противоопухолевого действия (ANTES, версия 7.0.0.0).

При осуществлении другого подхода к оценке эффективности *in vivo* CLDN6-экспрессирующие

клетки трансплантировали в правую боковую область hCD3/hCD137-мышей. В день 9 мышей разделяли случайным образом на группы в соответствии с размером опухоли и их весом тела, и им инъецировали i.v. наполнитель или антитела, полученные согласно методу, описанному в примере 3. Объем опухоли измеряли дважды в неделю. Для анализа IL-6 у мышей брали кровь через 2 ч после обработки. Образцы плазмы анализировали с использованием панели Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 согласно протоколу производителя.

Пример 8. Оценка *in vitro* цитотоксической активности с использованием анализа высвобождения лактатдегидрогеназы.

Цитотоксическую активность триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab PPU4135 оценивали с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH).

Линию клеток рака желудка человека NUGC-3 (JCRB), линию клеток тератокарциномы человека RA-1 (ATCC), линию клеток рака матки человека SNG-M (JCRB), линию опухолевых клеток зародышевых клеток яичек человека NEC8 (JCRB) и линию опухолевых клеток желточного мешка человека NEC14 (JCRB), которые экспрессируют человеческий CLDN6, применяли в качестве клеточных мишеней.

После замораживания PBMC (CTL, цитотоксические лимфоциты) отмывали, используя отмывку, препятствующую образованию агрегатов CTL, и среду RPMI-1640 (фирма SIGMA), содержащую 10% FBS (которую обозначали как 10% FBS/RPMI), количество PBMC доводили до 3×10^6 клеток/мл. Указанные PBMC применяли в качестве эффекторных клеток.

Клетки-мишени отделяли от культуральной колбы и высевали из расчета 100 мкл/лунку ($1,5 \times 10^4$ клеток) в прозрачный 96-луночный планшет с U-образным дном (фирма Corning). В лунки добавляли 50 мкл раствора человеческих PBMC ($1,5 \times 10^5$ клеток) и 50 мкл полученного антитела в концентрации, выбранной из 0,004, 0,04, 0,4, 4 или 40 нМ соответственно. После инкубации в течение ночи при 37°C планшет центрифугировали и 100 мкл супернатанта культуры из каждой лунки переносили в новый плоскодонный прозрачный 96-луночный планшет. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл реагента для детекции LDH (раствор красителя, содержащий катализатор, фирма TaKaRa), после чего инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Абсорбцию измеряли при 490 нм и 620 нм с помощью устройства En Vision (фирма PerkinElmer Japan).

Уровень цитотоксической активности (%) рассчитывали на основе различия абсорбции между 490 нм и 620 нм с помощью следующей формулы:

$$\text{Цитотоксическая активность (\%)} = (A - B - V) \times 100 / (G - V),$$

в которой "А" обозначает величину абсорбции в лунках, обработанных антителом и PBMC, "В" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, содержащих только эффекторные PBMC-клетки, "С" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, содержащих только необработанные клетки-мишени, и "Г" обозначает среднюю величину абсорбции в лунках, в которых осуществляли лизис клеток-мишеней путем обработки Тритон-Х. Среднюю величину абсорбции в лунках с культуральной средой вычитали из всех величин абсорбции. Кроме того, цитотоксичность, рассчитанную в лунке, содержащей PBMC и клетки-мишени без антитела, принимали за 0%. Установлено, что триспецифические антитела анти-CLDN6/Dual-Fab обладали зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичностью в отношении всех применяемых клеточных линий.

Результаты представлены на фиг. 7.

Пример 9. Анализ ингибирования роста клеток в реальном времени (xCELLigence-анализ).

Зависящее от Т-клетки ингибирование роста, опосредуемое триспецифическими антителами анти-CLDN6/Dual-Fab, оценивали с помощью анализа пролиферации клеток, используя устройство xCELLigence RTCA MP (фирма ACEA Biosciences).

Линию клеток рака яичника человека NIH:OVCAR-3 (ATCC) и линию клеток рака легкого человека NCI-H1435 (ATCC), которые экспрессируют человеческий CLDN6, применяли в качестве клеточных мишеней.

Отбирали с помощью шприца 50 мл периферической крови здоровых взрослых доноров, которым предварительно инъецировали 500 мкл раствора гепарина (1000 ед./мл) (фирма NovoNordisk). Периферическую кровь, разделенную на четыре равные части путем разведения с использованием ЗФР(-), инъецировали с 15 мл Фиколл-Пак PLUS и центрифугировали в пробирке для разделения лимфоцитов Leucoserp (фирма Greiner Bio-One). После центрифугирования в пробирке для разделения (2150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре), отделяли слой фракции мононуклеарных клеток периферической крови (обозначены далее в настоящем описании как PBMC). После однократной промывки PBMC средой RPMI-1640 (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (обозначена как 10%FBS/RPMI), количество PBMC доводили до 4×10^5 клеток/мл. Указанные PBMC применяли в качестве эффекторных клеток.

1×10^4 клеток-мишеней высевали в 96-луночный планшет E-Plate (фирма Roche Diagnostics) из расчета 100 мкл/лунку. После культивирования в течение ночи добавляли из расчета 50 мкл/лунку 2×10^4 Т-клеток вместе с антителом в концентрации, выбранной из 0,004, 0,04, 0,4, 4 или 40 нМ соответственно. Осуществляли мониторинг роста клеток каждые 15 мин, используя xCELLigence, в течение 72 ч в процессе инкубации планшетов. Уровень ингибирования клеточного роста (CGI: %) определяли на основе

величины клеточного индекса согласно следующей формуле:

$CGI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$. « CI_{Ab} » обозначает величину клеточного индекса в лунках с антителом в конкретный экспериментальный момент времени, а " CI_{NoAb} " обозначает среднюю величину клеточного индекса в лунках без антитела в этот же экспериментальный момент времени.

Результаты продемонстрировали, что все триспецифические антитела анти-CLDN6/Dual-Fab ингибировали клеточный рост экспрессирующих CLDN6 линий раковых клеток (OVCAR-3 и NCI-H1435) в зависимости от дозы.

Результаты представлены на фиг. 8.

Пример 10. Т-клеточная активация при совместном культивировании линий клеток NFAT-luc2 Jurkat и CLDN6-экспрессирующих опухолевых клеток.

Т-клеточную активацию в результате связывания CD3 триспецифическими антителами анти-CLDN6/Dual-Fab количественно измеряли с помощью системы для анализа люциферазы, используя GloResponse NFAT-luc2 Jurkat-клетки (фирма Promega, J1601) в качестве эффекторных клеток. Линию клеток рака яичника человека OVCAR-3(ATCC) и линии клеток аденокарциномы легкого человека NCI-H1435 (ATCC) применяли в качестве клеток, эндогенно экспрессирующих клаудин-6. Линию клеток рака мочевого пузыря человека 5637 (ATCC) применяли в качестве CLDN6-негативных клеток.

Анализ осуществляли согласно описанной ниже процедуре. Сначала описанные выше линии раковых клеток отделяли от культуральной колбы и высевали из расчета 25 мкл/лунку (2×10^4 клеток) в белый плоскодонный 96-луночный планшет (фирма Coster, №3917). Затем добавляли из расчета 25 мкл/лунку 1×10^5 клеток репортерной клеточной линии Jurkat/NFAT-RE вместе с антителом в концентрации, выбранной из 0,003, 0,03, 0,3, 3 или 30нМ соответственно. После культивирования в течение ночи при 37°C добавляли 75 мкл/лунку реагента Bio-Glo (фирма Promega, № G7941) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем люминесценцию, испускаемую активированными клетками Jurkat, измеряли с помощью ридера EnSpire (фирма PerkinElmer Japan). Соотношение люминесценции в каждой из лунок рассчитывали путем сравнения лунок с антителом и без него.

Результаты, демонстрирующие способность триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab и антитела CS3348 активировать NFAT-сигнал при применении в качестве клеток-мишеней CLDN6-экспрессирующих линий клеток человека (OVCAR3 и NCI-H1435) и линии CLDN6-негативных клеток (5637), представлены на фиг. 9.

В присутствии линий клаудин-6-позитивных клеток обнаружена зависящая от дозы активация NFAT всеми антителами. С другой стороны, практически никакой активации не выявлено даже при применении антитела в высокой концентрации в присутствии клаудин-6-негативных клеток линии 5637.

Пример 11. Активация NF-каппа В в клетках Jurkat, экспрессирующих человеческий 4-1BB, и репортерных клеточных линий, экспрессирующих люциферазу, совместно культивируемых с CLDN6-экспрессирующими опухолевыми клетками.

Активацию NF-каппа В в результате связывания CD137 триспецифическими антителами анти-CLDN6/Dual-Fab оценивали, используя GloResponse™ NF kappa В luc2/4-1BB Jurkat-клетки (фирма Promega, CS196004). Линию клеток рака яичника человека OVCAR-3 (ATCC) и линию клеток аденокарциномы легкого человека NCI-H1435 (ATCC) применяли в качестве клеток, эндогенно экспрессирующих клаудин-6. Линию клеток рака мочевого пузыря человека 5637 (ATCC) применяли в качестве CLDN6-негативных клеток.

Анализ осуществляли согласно описанной ниже процедуре. Сначала описанные выше линии раковых клеток отделяли от культуральной колбы и высевали из расчета 25 мкл/лунку (2×10^4 клеток) в белый плоскодонный 96-луночный планшет (фирма Coster, №3917). Затем вносили 5×10^4 клеток репортерной клеточной линии NF-каппа В luc2/4-1BB Jurkat и смешивали с 25 мкл среды, содержащей титрованные антитела. Планшеты для анализа инкубировали в течение 6 ч при 37°C, затем добавляли 75 мкл/лунку реагента Bio-Glo (фирма Promega, № G7941) с последующей дополнительной инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем люминесценцию, испускаемую активированными клетками Jurkat, измеряли с помощью ридера EnVision (фирма PerkinElmer Japan). Соотношение люминесценции в каждой из лунок рассчитывали путем сравнения лунок с каждым антителом (0,003, 0,03, 0,3, 3 и 30нМ) и без антитела.

Результаты, демонстрирующие способность триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab и антитела CS3348 активировать сигнал NF-каппа В при применении в качестве клеток-мишеней CLDN6-экспрессирующих линий клеток человека (OVCAR3 и NCI-H1435) и линии CLDN6-негативных клеток (5637), представлены на фиг. 10.

В присутствии линий клаудин-6-позитивных клеток обнаружена зависящая от дозы активация NF-каппа В всеми антителами. Важно отметить, что наиболее выраженная активация обнаружена в присутствии триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab. С другой стороны, практически никакой активации не выявлено даже при применении антитела в высокой концентрации в присутствии клаудин-6-негативных клеток линии 5637.

Пример 12. Изучение противоопухолевой эффективности *in vivo*.

Противоопухолевую эффективность *in vivo* триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab оценивали с использованием модели несущих опухоли мышей. Человеческую линию раковых клеток, экспрессирующую человеческий CLDN6 (NCI-H1435 или OV-90), трансплантировали подкожно гуманизированным мышам линии NOG, которым инъецировали человеческие стволовые клетки, полученные из пуповинной крови (мышинная модель HuNOG). Несущих опухоли мышей случайным образом разделяли на группы обработки, которым вводили антитело или наполнитель в качестве контроля (табл. 10).

После рандомизации и разделения мышей на группы в зависимости от размера опухолей и веса тела в день 8 (NCI-H1435) или в день 16 (OV90) после трансплантации внутривенно вводили триспецифические антитела анти-CLDN6/Dual-Fab. Триспецифические антитела анти-CLDN6/Dual-Fab вводили только один раз. Измеряли длину (L) и ширину (W) опухолевой массы и вес тела и объем опухоли (TV) рассчитывали следующим образом: $TV=(L \times W \times W)/2$. Противоопухолевую активность, обнаруженную в группах, обработанных триспецифическими антителами анти-CLDN6/Dual-Fab, сравнивали с обработанной носителем контрольной группой (фиг. 11 и фиг. 12).

Таблица 10

Подробная информация об исследуемых группах, на которых проводили оценку эффективности *in vivo*.

а) Исследуемые группы при использовании модели, созданной на мышах NCI-H1435/HuNOG

Группа	Антитело	Доза
1	Наполнитель	-
2	CS3348	1 мг/кг
3	PPU4134	1 мг/кг
4	PPU4135	1 мг/кг
5	PPU4136	1 мг/кг
6	PPU4137	1 мг/кг
7	PPU4138	1 мг/кг

б) Исследуемые группы при использовании модели, созданной на мышах OV-90/HuNOG

Группа	Антитело	Доза
1	Наполнитель	-
2	CS3348	0,05 мг/кг
3	CS3348	0,2 мг/кг
4	PPU4135	0,05 мг/кг
5	PPU4135	0,2 мг/кг

Пример 13. Изучение токсичности триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab.

Потенциальную токсичность антитела PPU4135 (триспецифическое антитело анти-CLDN6/Dual-Fab) оценивали в опыте по изучению токсичности на обезьянах циномоглус в сравнении с антителом CS3348 (биспецифическое антитело анти-CLDN6/CD3). Поскольку оба антитела PPU4135 и CS3348 дают перекрестную реакцию с их антигенами обезьян циномоглус, то обезьяны циномоглус выбраны в качестве вида животных для исследования в токсикологических опытах *in vivo*. Обобщение схемы однократных токсикологических исследований представлено в табл. 11. Поскольку по результатам токсикологических исследований самцы оказались более чувствительными, чем самки животных при изучении токсичности CS3348 (фиг. 13), оценку опосредуемой PPU4135 токсичности осуществляли на 2 самцах. В этих исследованиях использовали уровни доз 100 мкг/кг (для CS3348) или 90 мкг/кг (для PPU4135), что примерно в 2,57 раз превышает эффективную концентрацию, обеспечивающую 80% от максимального ответа.

Таблица 11

Сводка данных о токсикологических исследованиях

Тип исследований	Вид	Обработка/ период наблюдения	Животные	Доза (мкг/кг)
Токсичность однократной дозы				
[CS3348] Однократная доза	Обезьяна циномолгус (возраст 3-4 года)	Однократная IV доза, 8 дней	1 самец и 1 самка	100
[PPU4135] Однократная доза	Обезьяна циномолгус (возраст 4 года)	Однократная IV доза, 29 дней	2 самца	90

IV=внутривенно

У самцов животных, обработанных CS3348 или PPU4135, уровни экспозиции в плазме оказались сопоставимыми в группе, обработанной PPU4135, и в группе, обработанной CS3348, вплоть до дня 8. Увеличенные уровни AST (аспартатаминотрансфераза), ALT (аланинаминотрансфераза) и GLDH (глутаматдегидрогеназа) (печеночные ферменты); ALP (щелочная трансфераза), TBIL (общий билирубин), GGT (гамма-глутамилтранспептидаза) и BA (общая желчная кислота) (параметры повреждения гепатобилиарной системы); и CRP (С-реактивный белок) (маркер воспаления) обнаружены после однократного введения указанных антител (фиг. 13). Хотя различия в уровнях печеночных ферментов между самцами животных, обработанных указанными антителами, были незначительными (фиг. 13), параметры повреждения гепатобилиарной системы и повышение уровня маркеров воспаления были значительно более низкими при введении PPU4135 по сравнению с введением CS3348 в течение всего периода исследований (фиг. 13). Эти результаты позволяют предположить, что гепатотоксичность, опосредованная тестируемым изделием, главным образом повреждение гепатобилиарной системы, ослабляется при использовании триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab по сравнению с использованием биспецифического антитела анти-CLDN6/CD3.

Пример 14. Характеризация триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab.

Аффинность связывания триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab с содержащей CLDN6 человека и обезьян цинномолгус (супо) VLP (вирусоподобная частица) при pH 7,4 определяли при 25°C с использованием устройства Biacore T200 (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческому CD81 (фирма BD Pharmingen) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного C1-чипа с использованием набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). VLP, несущие CLDN6 человека и супо, захватывали на поверхности сенсора с помощью антитела к человеческому CD81. Каждую VLP 5-кратно разводили буфером (20мМ Na-фосфат, 150мМ NaCl, 0,1 мг/мл БСА, 0,005% NaN₃, pH 7,4). Тестируемое антитело приготавливали в буфере (20мМ Na-фосфат, 150мМ NaCl, 0,1 мг/мл БСА, 0,005% NaN₃, pH 7,4). Триспецифическое антитело анти-CLDN6/Dual-Fab инъецировали в концентрациях 50 и 200нМ с последующей диссоциацией. Поверхность сенсора регенерировали после каждого цикла с помощью 0,1% ДСН и 100мМ H₃PO₄. Как продемонстрировано в табл. 12, аффинность связывания PPU4135 с супо CLDN6 сопоставима с аффинностью связывания с человеческим CLDN6. Аффинность связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare).

Аффинность связывания триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab с рекомбинантными человеческими и супо CD3eg (гамма- и эпсилон-субъединицы CD3) при pH 7,4 определяли при 25°C с использованием устройства Biacore 8K (фирма GE Healthcare). Аффинность связывания триспецифического антитела анти-CLDN6/Dual-Fab с рекомбинантными человеческими CD137 при pH 7,4 определяли при 37°C с использованием устройства Biacore 8K (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc (фирма GE Healthcare) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа с использованием набора для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). Тестируемое антитело и аналиты приготавливали в ACES-буфере (pH 7,4), содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃. Триспецифическое антитело анти-CLDN6/Dual-Fab Anti-CLDN6/Dual-Fab захватывали на сенсорной поверхности с помощью антитела к Fc. Уровни захвата антитела соответствовали 300 резонансным единицам (RU). Рекомбинантные CD3eg и CD137 инъецировали в двух концентрациях 500 и 2000нМ с последующей диссоциацией. Поверхность сенсора регенерировали после каждого цикла с помощью 3М MgCl₂. Как продемонстрировано в таблице 12, аффинность связывания PPU4135 с супо CD3eg и супо CD137 сопоставима с аффинностью связывания с человеческими CD3eg и CD137 соответственно. Аффинность связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (фирма GE Healthcare).

Таблица 12

Аффинность связывания PPU4135 с антигенами человека и обезьян циномоглус

Антиген	Аффинность		
	ka (1/Мс)	ka (1/с)	KD (М)
Человеческий	2.17E+05	7.94E-04	3.65E-09
супо CLDN6	2.18E+05	8.21E-04	3.77E-09
Человеческий CD3eg	7.80E+04	2.66E-02	3.41E-07
супо CD3eg	1.01E+05	3.32E-02	3.29E-07
Человеческий CD137	1.26E+04	5.91E-04	4.68E-08
супо CD137	8.35E+03	1.46E-03	1.74E-07

(Обозначение E, используемое в таблице для описания величин ka (1/Мс), kd (1/с) и KD, означает "10 в определенной степени", например, 2,17E+05=2,17×10⁵.)

Референс-пример 1. Очистка триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей клонировали в экспрессионных векторах, содержащих константные области тяжелых и легких цепей с соответствующими мутациями, способствующими гетеродимеризации.

Для крупномасштабного получения триспецифических антител анти-CLDN6/Dual-Fab для осуществления опытов *in vitro* и *in vivo* антитела кратковременно экспрессировали с использованием клеток Expi293F (фирма Life technologies) согласно инструкциям производителя. Культуральную среду, содержащую рекомбинантные антитела, сначала очищали с использованием колонки MabSelect Sure (фирма GE healthcare) и элюировали с помощью 50мМ уксусной кислоты. Элюированные антитела нейтрализовали с помощью буфера, содержащего 1,5М Трис-HCl/1М аргинин-HCl. Затем ProA-элюаты вносили на катионообменную колонку HiTrap SP-HP (фирма GE healthcare) в буфере, содержащем 20мМ фосфат натрия, pH 6, и элюировали с помощью буфера, содержащего 20мМ фосфат натрия, 1М NaCl, pH 6. Фракции, содержащие биспецифическое антитело, объединяли и концентрировали. Для удаления высокомолекулярных и/или низкомолекулярных компонентов осуществляли гель-фильтрация в P1-буфере (20мМ гистидин, 150мМ аргинин, 162,1мМ Asp, pH 6,0), используя колонку Супердекс 200 (фирма GE healthcare). Очищенные биспецифические антитела концентрировали и хранили в холодильнике при -80°C.

Референс-пример 2. Создание экспрессирующих клаудин клеток Создавали Ва/F3-клетки, экспрессирующие человеческий CLDN6 (hCLDN6/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие человеческий CLDN9 (hCLDN9/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие человеческий CLDN3 (hCLDN3/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие человеческий CLDN4 (hCLDN4/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие мышинный CLDN6 (mCLDN6/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие мышинный CLDN9 (mCLDN9/BaF), Ва/F3-клетки, экспрессирующие мышинный CLDN3 (mCLDN3/BaF), и Ва/F3-клетки, экспрессирующие мышинный CLDN4 (mCLDN4/BaF), путем трансфекции линии мышинных про-B-клеток Ва/F3 экспрессионными векторами, кодирующими человеческий CLDN6, человеческий CLDN9 (SEQ ID NO: 198), человеческий CLDN3 (SEQ ID NO: 199), человеческий CLDN4 (SEQ ID NO: 200), мышинный CLDN6 (SEQ ID NO: 201), мышинный CLDN9 (SEQ ID NO: 202), мышинный CLDN3 (SEQ ID NO: 203) и мышинный CLDN4 (SEQ ID NO: 204) соответственно.

Белки семейства клаудинов имеют два внеклеточных домена, которые доступны для антитела. Касательно сходства аминокислотных последовательностей внеклеточных доменов человеческого CLDN6 и человеческого CLDN9, известно, что первые внеклеточные домены являются практически одинаковыми, а во вторых внеклеточных доменах присутствуют только две различные аминокислоты (фиг. 6). Глутамин в положении 156 человеческого клаудина 6 (положение 156 в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 196 или 197) заменяли на лейцин, с получением мутанта человеческого CLDN6, который содержит такую же аминокислоту, что и человеческий клаудин 9 в положении 156. Указанный мутант человеческого CLDN6 обозначали как hCLDN6(Q156L) (SEQ ID NO: 205). Создавали трансфектант Ва/F3, стабильно экспрессирующий hCLDN6(Q156L), используя метод, аналогичный описанному выше. Созданный трансфектант Ва/F3 обозначали как hCLDN6(Q156L)/BaF.

Создавали трансфектированные клетки FreeStyle™ 293-F, кратковременно экспрессирующие человеческие и мышинные CLDN3, 4, 6 и 9, путем интродукции экспрессирующего вектора для человеческих и мышинных CLDN (включая CLDN6, CLDN9, CLDN3 и CLDN4) в клетки FreeStyle™ 293-F (фирма Invitrogen), используя 293fectin (фирма Invitrogen). Созданные трансфектированные клетки FreeStyle™ 293-F обозначали как hCLDN3/FS293, hCLDN4/FS293, hCLDN6/FS293, hCLDN9/FS293, mCLDN3/FS293, mCLDN4/FS293, mCLDN6/FS293 и mCLDN9/FS293 соответственно.

Промышленная применимость

В настоящем описании представлены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые обладают способностью связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), но не могут связываться с CD3 и CD137 одновременно, и обладают способностью связываться с CLDN6. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, проявляют повышенную зависящую от

T-клетки цитотоксическую активность CLDN6-зависимым образом посредством связывания с CD3/CD137 и CLDN6. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и их фармацевтические композиции можно применять для таргетинга клеток, экспрессирующих CLDN6, применяемого в иммунотерапии для лечения различных видов рака, прежде всего ассоциированных с CLDN6, таких как CLDN6-позитивные виды рака.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной способностью, выбранной из группы, которая состоит из

(I) связывания с CD3,

(II) связывания с CD137 и

(III) способности связываться с CD3 и CD137, где первый антигенсвязывающий фрагмент связывается либо с CD3, либо с CD137; и где первый антигенсвязывающий фрагмент состоит из вариательной области первого антитела и вариательной области второго антитела; и

второй антигенсвязывающий фрагмент, где второй антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6), и где второй антигенсвязывающий фрагмент состоит из вариательной области третьего антитела и вариательной области четвертого антитела; и

в которой мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит любое (1)-(6), перечисленное ниже:

(1) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 11, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 17, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 23, вариательную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40; вариательную область третьего антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и вариательную область четвертого антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(2) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 9, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 15, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 21, и вариательную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 35, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 39, вариательную область третьего антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и вариательную область четвертого антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(3) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 10, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 16, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 22, и вариательную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 35, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 39; вариательную область третьего антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 14, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 20, и вариательную область четвертого антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 34, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 38;

(4) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 12, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 18, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 24, вариательную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40; вариательную область третьего антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19, и четвертую вариательную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37;

(5) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 11, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 17, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 23, вариательную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40; вариательную область третьего антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и вариательную область четвертого антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19;

(6) вариательную область первого антитела, которая содержит определяющий комплементарность

участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 12, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 18, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 24, переменную область второго антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 36, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 40; переменную область третьего антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 29, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 33, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 37, и переменную область четвертого антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 7, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 19.

2. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по 1, в которой переменные области антитела, содержащиеся в первом и/или втором антигенсвязывающих фрагментах, содержат каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизованного антитела.

3. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент обладает по меньшей мере одной способностью, выбранной из группы, которая состоит из

(I) связывания с CD3,

(II) связывания с CD137 и

(III) способности связываться с CD3 и CD137, где первый антигенсвязывающий фрагмент связывается либо с CD3, либо с CD137; и где первый антигенсвязывающий фрагмент состоит из переменной области первого антитела и переменной области второго антитела; и второй антигенсвязывающий фрагмент, где второй антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с клаудином-6 (CLDN6), и где второй антигенсвязывающий фрагмент состоит из переменной области третьего антитела и переменной области четвертого антитела; и в которой мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит любое (I)-(VI), перечисленное ниже:

(I) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(II) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(III) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

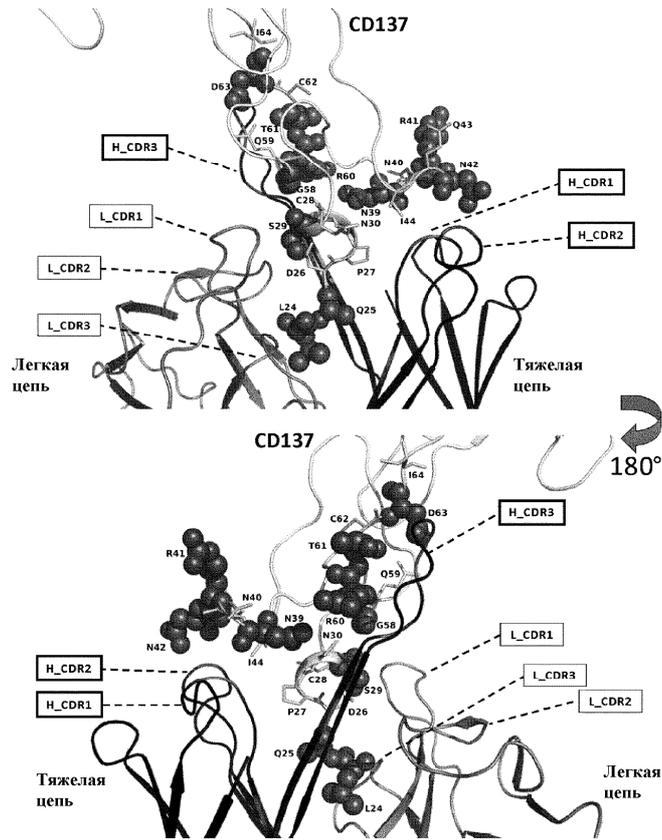
(IV) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(V) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

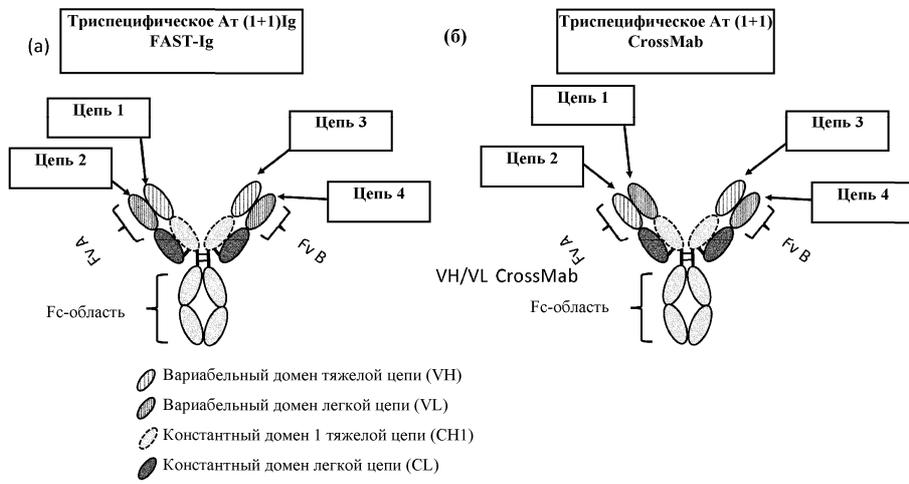
(VI) переменную область первого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, переменную область второго антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, переменную область третьего антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и переменную область четвертого антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

4. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-3, которая содержит дополнительно Fc-домен, обладающий пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

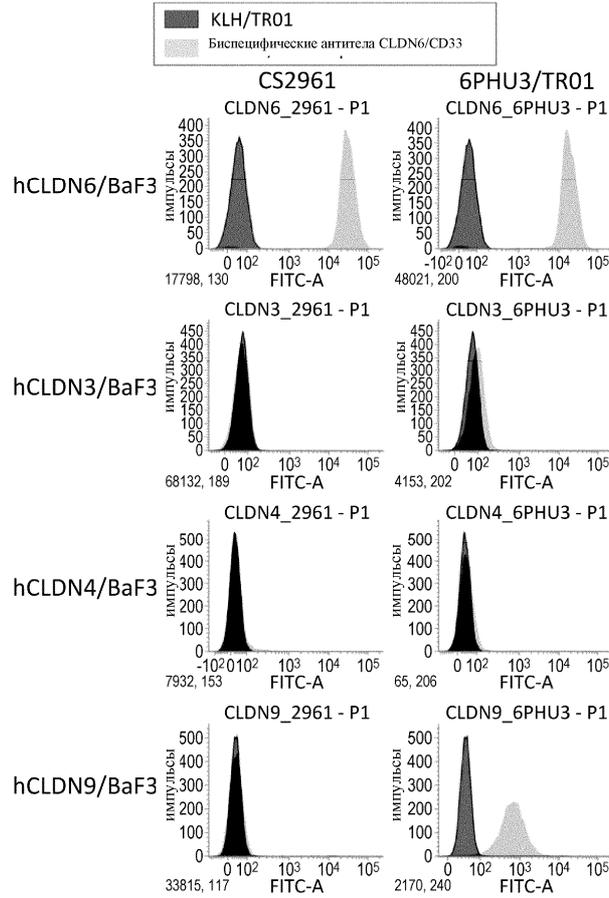
5. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-3, в которой первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью первой легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй тяжелой цепи, четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента слита с константной областью второй легкой цепи, в которой константные области содержат



Фиг. 2

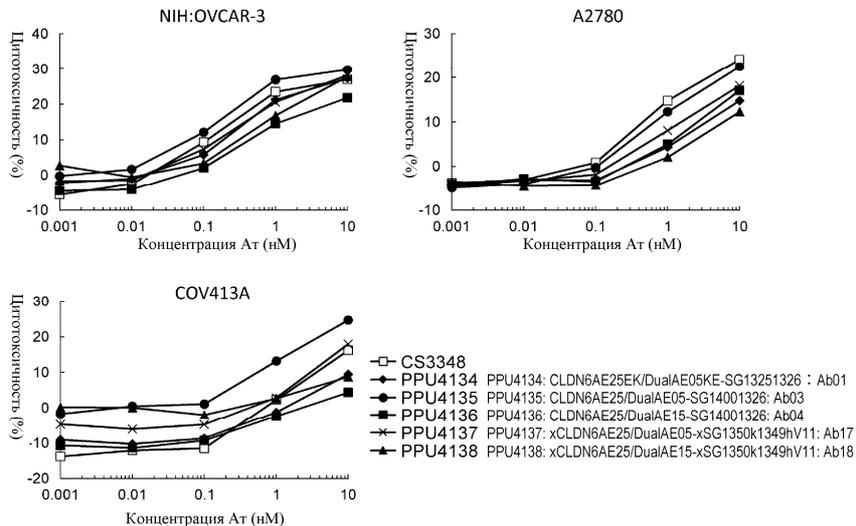


Фиг. 3



Фиг. 4

Анализ LDH

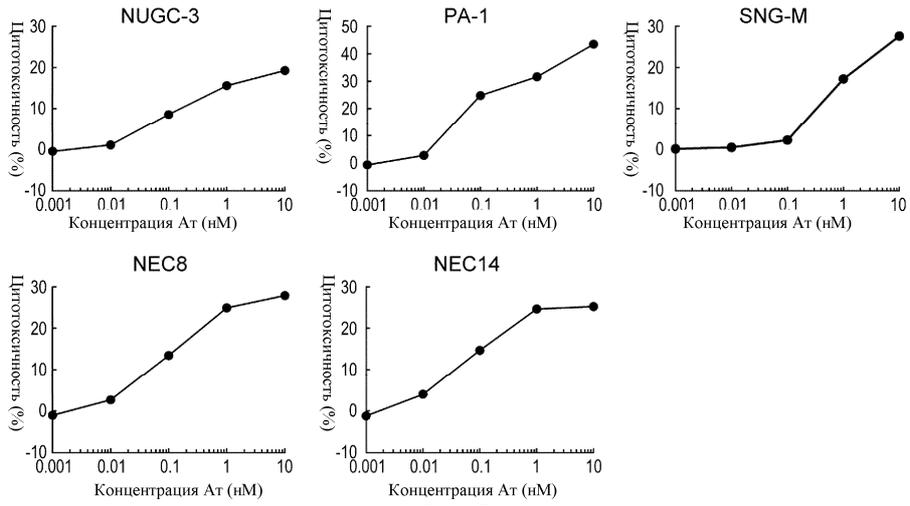


Фиг. 5

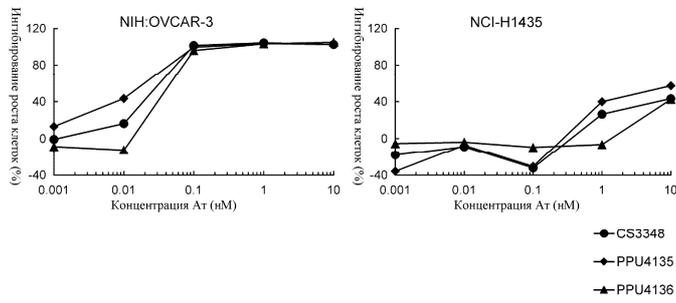
		Внеклеточный домен 1			
hCLDN6	1	MASNMQILG	VLTLLGW	NGLVSCALP	IKVTF
hCLDN9	1	MASNMLELGL	VLTLLGW	GLVSCALP	IKVTF
hCLDN6	91	ALFGLLVYLAGAK	CTTCV	EKDSKAR	LVLTSL
hCLDN9	91	ALFGLLVYAITGAC	CTTCV	DEGKAR	LVLTSL
hCLDN6	181	LCCTCFSGGS	QGF	SHYMAR	YSISAF
hCLDN9	181	LCCTCFPSHFER	PRG	PLRYSI	PSR

Внеклеточный домен 2

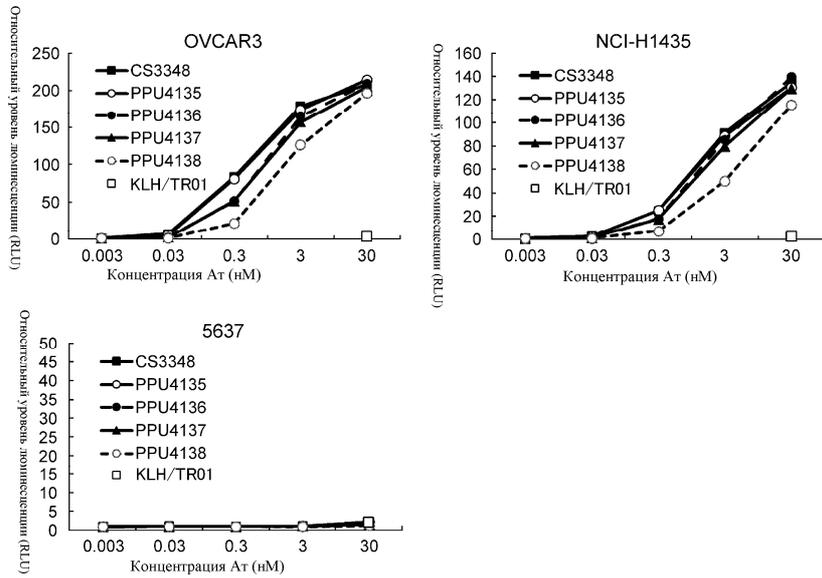
Фиг. 6



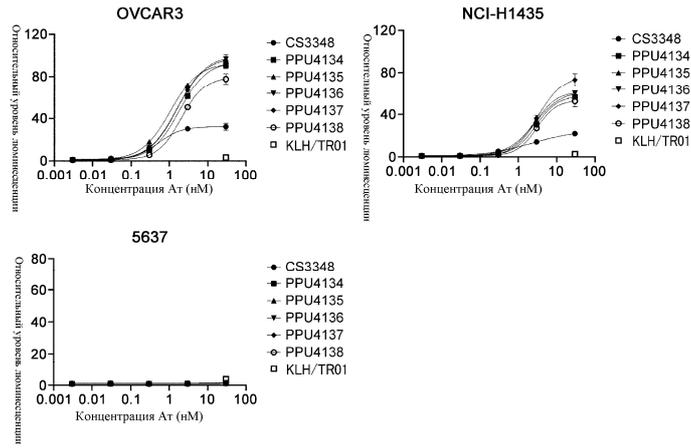
Фиг. 7



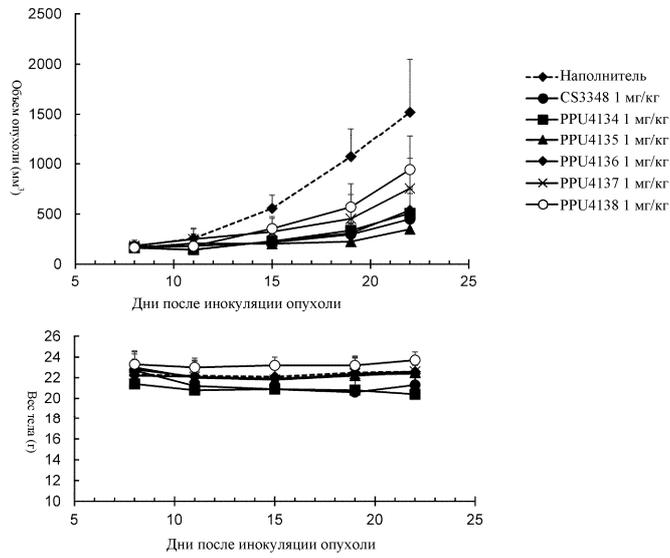
Фиг. 8



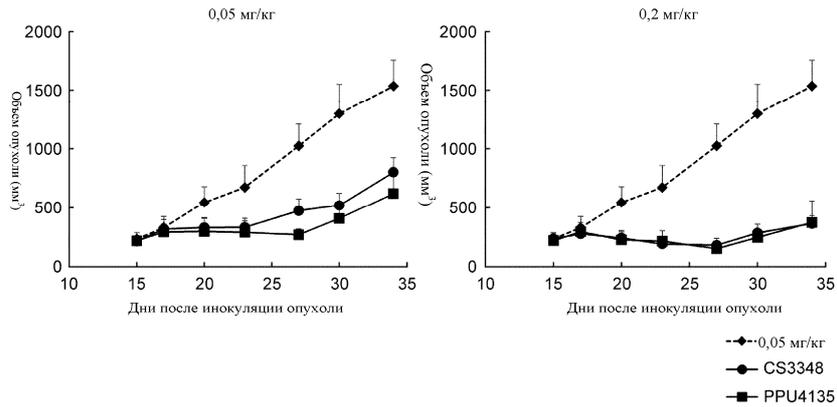
Фиг. 9



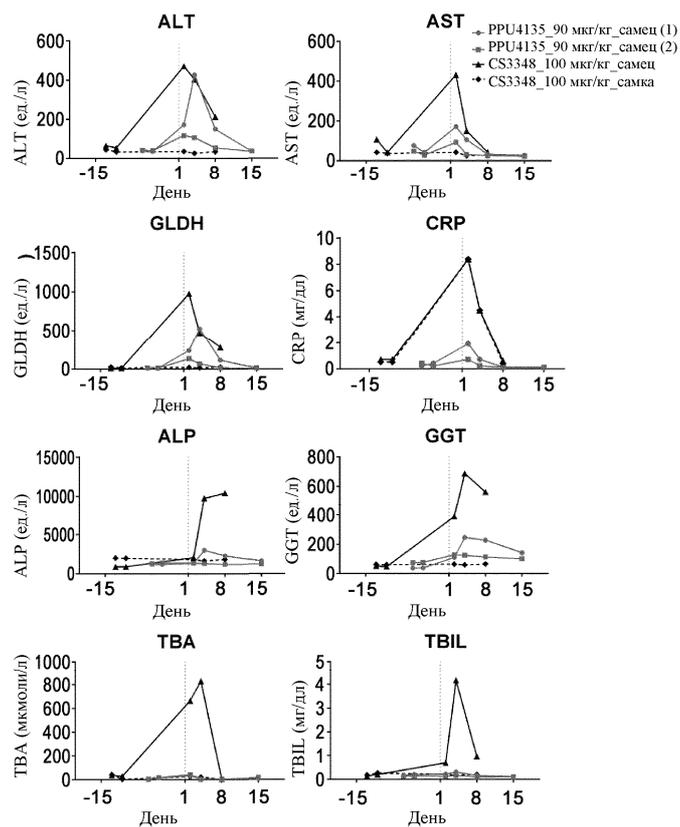
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2